



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА**  
**„Проф. д-р Параскев Стоянов“**

---

д-р Асен Йорданов Пачеджиев

**„БАНКИРАНЕ НА РЕЗИДУАЛНА УМБИЛИКАЛНА КРЪВ:  
АКУШЕРСКИ И БИОЕТИЧНИ АСПЕКТИ“**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“  
по научна специалност „АКУШЕСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ“, шифър 03.01.45.

Научен ръководител: доц. д-р Иван Атанасов Костов, д.м.н.

декември 2017 г.

Дисертационният труд е написан на 179 стандартни страници. Библиографската справка включва 237 източника, от които 8 на кирилица и 229 на латиница. Материалът е онагледен с 25 фигури и 68 таблици.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита от Катедрения съвет на Катедра „Акушерство и гинекология”, Медицински университет – Варна с протокол No 178 /05.12.2017 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.02.2018 г. от 11.30 часа в УМБАЛ „Св. Марина” пред научно жури в състав:

Председател: Проф. д-р Емил Ковачев, дмн, МУ - Варна

Членове: Доц. д-р Иван Костов, дмн, МУ - Варна

Проф. д-р Асен Николов, дм, МУ - София

Проф. д-р Петър Петров, дмн, МУ - Пловдив

Доц.д-р Валентина Мазнейкова, дм, МУ - Плевен

Резервни членове: Доц. д-р Жана Големанова, дм, МУ - София

Проф. д-р Стефан Иванов, дмн, МУ - Варна

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел и са публикувани в интернет страницата на МУ – Варна.

Забележка: Номерата на таблици и фигури в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

## **С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е**

1. ВЪВЕДЕНИЕ .....	6
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	10
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	19
4. РЕЗУЛТАТИ .....	22
5. ОБСЪЖДАНЕ.....	114
6. ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	118
7. НАУЧНИ ПРИНОСИ .....	76
8. ПУБЛИКАЦИИ И СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА .....	77



## RESIDUAL CORD BLOOD BANKING: OBSTETRIC AND BIOETHICAL ASPECTS

### Abstract:

Umbilical cord blood (CB) is a valuable source of stem-and-progenitor cells used for an increasing number of conditions. Being directly involved in recruitment and selection of the donors, as well as in collection of the samples, obstetricians are key players in the process of CB-banking. In contrast to what happened in other countries, in Bulgaria private CB banking emerged first while the single public bank set foot only in 2012. By now the existing pool of cryopreserved CB-units from Bulgarian donors is consisting of more than 15`000 privately banked CB-units and just about 250 units stored at the public bank.

### Materials and

**methods:** The present study aimed at assessing the impact of various obstetric, laboratory and neonatal factors on the therapeutic utility of banked cord blood, as well as at assessing the awareness level and the attitudes towards CB-banking of pregnant women and obstetricians. A representative sample of 721 privately banked CB-units was subjected to descriptive and correlational analysis. Awareness and attitudes were assessed based on structured questionnaires received by 976 women and 69 obstetricians.

**Results and discussion:** We established the following average values: Volume (V) - 95.4 ml ( $93.1 \leftrightarrow 97.6$ , CI=95%); Total nucleated cell count after processing (TNCpost) -  $8.9 \times 10^8$  ( $8.5 \leftrightarrow 9.3 \times 10^8$ , CI=95%); Post-processing cell count for CD34+ -  $21 \times 10^5$  ( $19 \leftrightarrow 22 \times 10^5$ , CI=95%); post-processing viability for CD34+ - 98.5%. There were 48 (6.7 %) bacterially contaminated samples whereas vaginal birth was associated with contamination (93% of the cases,  $p < 0.05$ ). We confirmed the strong association between CB-volume and cell counts. According to our results, the rest of the associations between various neonatal (physiological) factors and the cord blood preparation parameters are rather of less practical value for the selection of the donors.

**Conclusion:** It was our initial hypothesis that most of the privately banked CB-units do not meet the therapeutic quality criteria which might justify the concept of “lifelong biological insurance policy”. This hypothesis was partly confirmed as we found that after 14 years of cryoconservation only about 15.4% of the banked samples provide the necessary cell dose for an autologous transplant. In spite of this finding, the overall quality of the privately banked CB-units` pool in Bulgaria is comparable with and even better than that of biological material banked by other private and public banks. Yet our finding about the therapeutic utility of the CB-samples seems to be in dire contrast with the prevailing “bio-insurance” perception among 94% of pregnant-and-birth delivering women. Over 80% of the respondents claim that each pregnant woman should be informed about the options to donate or store privately cord blood. On the other hand just 1/5 of the responding obstetricians felt like being enough prepared to brief adequately their patients on the topic. About 96-97% of the residual cord blood is being disposed of and the access to the single public bank is limited. Therefore, most of the Bulgarian pregnant women can choose between private banking and disposing of the cord blood, rather than between donation and private storage.

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Умбиликалната кръв (УК) е ценен биологичен ресурс, с нарастваща роля при лечението на все по-голям брой, предимно злокачествени и дегенеративни заболявания. В своята цялост, умбиликалната кръв е нещо повече от „стволови клетки“, тъй като освен примитивни плури - и мултипотентни клетки, съдържа множество по-зрели прогенитори в различен стадий на диференциация, но с висок пролиферативен потенциал. Освен прякото регенеративно въздействие, УК има изяви (паракринни) имуномодулиращи и антиинфламаторни свойства. Съчетаването на тези свойства със способността на незрелите клетки да се самонасочват към мястото на тъканно увреждане (т.нар. „хоуминг“) придават на УК функцията на мощен стимулатор, на авторепаративните процеси в организма. Традиционните клинични индикации за приложение на УК са свързани с трансплантацията на хемопоестични стволови и прогениторни клетки, при ограничен брой хематологични и автоимунни заболявания. Напоследък, УК се прилага и извън този контекст, при нарастващ брой нехематологични състояния. Ежегодно, донорските банки за умбиликална кръв отпускат за терапевтични нужди по 3 000 – 4 000 обработени и криоконсервирани единици умбиликална кръв (еУК). Възможността за дългосрочна криоконсервация (например, за 20-30 години) и пренебрежимото влияние на продължителността на криогенното съхранение върху жизнеността на съдържащите се в УК стволови и прогениторни клетки създават предпоставки за т.нар. „биологично банкиране“ (банкиране) на умбиликалната кръв. Съществуват 2 основни типа биобанки за умбиликална кръв:

- насочените към задоволяване на популационните нужди *донорски банки*, които съхраняват и отпускат проби за алогенно приложение;
- насочените към покриване на евентуални индивидуални или близкородствени (семейни) нужди на самия донор *частни банки*, съхраняващи проби от умбиликална кръв срещу заплащане и отпускащи тези проби за автоложно или близкородствено-алогенно приложение.

За разлика от ситуацията в повечето държави, първоначално у нас се разви частното банкиране на УК и едва през 2012 година започна дейността на публичната банка.

Акушер-гинеколозите играят съществена роля при банкирането на УК, тъй като са пряко ангажирани с привличането и селекцията на потенциални донори. В болшинството от случаите, акушер-гинеколозите осъществяват пробовзимането на УК.

За бременната, акушер-гинекологът е основен източник на информация по темата за „стволовите клетки“.

Разнообразни физиологични и акушерски фактори влияят върху качеството и терапевтичната годност на даряваните и съхраняваните проби от УК. Проучването на тези фактори може да допринесе за оптимизация на цялостния процес на биологично банкиране. По данни от ежегодните доклади на Световната асоциация по костно-мозъчно дароство (World Marrow Donor Association), България е на едно от последните места в Европа, по степен на осигуряване с източници на ХСК. Това обстоятелство налага популационния и биоетичния поглед върху банкирането на УК, като важни аспекти, наред с медико-практичните съображения. Изграждането на достатъчен и качествен (т.е. годен за терапевтично усвояване) национален резерв от единици умбиликална кръв би покрило нуждите от стволово-клетъчни алографти на близо 2/3 от нуждаещите се пациенти (за които, по презумпция липсва близкородствен даро) и би спестило ценен обществен ресурс, необходим за закупуване на биологичен материал от чуждестранни банки и регистри. В близко бъдеще, наличието на подобен резерв би обезпечило биологичната основа, за навлизането на персонализираните клетъчни терапии.

От полза би било и проучването на факторите, определящи избора на бременните, отнасящ се до алтернативите за дароство, за съхранение в частна биобанка или просто за унищожаване на остатъчната УК при раждане, като биологичен отпадък. То би спомогнало за преодоляване на съществуващия у нас към момента дисбаланс, между частно (автоложно) и алтруистично (алогенно) банкиране на УК. Проучването и формирането на адекватно ниво на информираност сред бременните и медицинските специалисти има пряко значение за поставяне на дейността по банкиране на УК на етични и научно-обосновани принципи, като алтернатива на комерсиализма.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

Целта на изследователския проект беше да предложи опорни точки за оптимизиране ролята на акушер-гинеколозите и ангажираната пряко с контрол на дейността по банкиране на УК институция (*Изпълнителна агенция по трансплантациите, ИАТ*), с оглед осигуряване на адекватен резерв от единици УК, покриващи популационните нужди от лечение със стволово-клетъчни препарати. Множество професионални и научни дружества по акушерство и гинекология, в други държави, вече са формулирали подобни политики и практики, в рамките на консенсуси, препоръки или становища. Практиката показва, че ефектът от подобни политики е оптимален, ако те отчитат местните медико-практични, регулаторни, икономически и културни особености.

**Задачите на проучването са:**

**2.1.1. Да опише и оцени дейността по банкиране на УК, на базата на наличния резерв от обработени и съхранени единици умбиликална кръв (еУК) в частните банки.**

Поради споменатото историческо развитие на дейността по банкиране на УК у нас, към момента, националният резерв се състои предимно от криоконсервирани и съхранявани в частни банки еУК (> 15 000 еУК в частни банки, срещу около 250 еУК в националната донорска банка).

**2.1.2. Да проучи влиянието на редица акушерски, лабораторни и неонатални (физиологични) фактори върху терапевтичната пригодност на съхраняваните еУК.** Освен от степента на тъканна съвместимост (в алогенния контекст), терапевтичната пригодност на съхраняваните еУК (т.е. качеството и безопасността) се определя от някои основни биологични характеристики, като: *обем, общ брой на ядрените клетки след обработка, брой и жизнелост на CD34 - експресиращите клетки (CD34+).* Значение има и *стерилността на съхраняваните проби, респ. относителния дял на бактериалните контаминации.*

**2.2.2. Да проучи информираността и нагласите сред бременните, родилките и сред акушер-гинеколозите,** към възможността за алтруистично дарство на УК в обществена биобанка или за съхранението ѝ, като вид „биологична застраховка“ за индивидуални и близкородствени здравни нужди.

**2.2.3.** На базата на резултатите от проучванията, **да направи изводи за общественоздравния ефект от дейността по банкиране на УК до момента и да предложи мерки за оптимизирането ѝ**, с оглед на популационните нужди в страната.

**Изследователски хипотези:**

По отношение на наличния резерв от обработени и съхранени в частни банки еУК допуснахме, **че е твърде вероятно, същият да не отговаря по качество и терапевтична годност на представите за дълготрайна „биологична застраховка“**, за период от 20 – 30 г., с какъвто анонс, частните банки за УК предлагат услугите си на потребителите.

По отношение на **влиянието на основните акушерски, лабораторни и неонатални (физиологични) фактори** върху качеството и терапевтичната пригодност на съхраняваните еУК допуснахме, **че ще потвърдим или отхвърлим резултатите от наблюденията на други изследователи.**

В частност, особен интерес за нас представляваха делът на криоконсервираните проби с ниско клетъчно съдържание, делът на бактериално контаминираните проби, както и интрапарталните фактори, които биха имали отношение към честотата на контаминациите. В литературата има сравнително оскъдни данни по този въпрос, поради факта, **че болшинството проучвания до момента са правени върху публично банкирани еУК, а достъпът до данни за пробите в частните банки е силно ограничен.**

По отношение на информираността и нагласите сред бременните, родилките и сред акушер-гинеколозите, **очаквахме да намерим несъответствие между нивото на информираност от една страна и очакванията към частното банкиране на УК, от друга страна.**

**Предмет на проучването:**

**2.3.1.** Оценка на съществуващия резерв от единици резидуална УК от български донори в частните биобанки, от гледна точка на акушерските и биоетичните аспекти на дейността.



**2.3.2. Оценка на информираността и нагласите към банкирането на УК** сред бременните и родилките от една страна и сред акушер-гинеколозите от друга страна, като бъдат съпоставени очакванията на бременните, с установените факти от оценката на резерва от УК в частните банки.

**Обект на проучването:**

Обект на проучванията по задачи 1 и 2 е **представителна извадка от 721** обработени и криоконсервирани в частна банка единици УК. Всички проби са **взети от** български донори, в периода юли 2014 г. – април 2016 г., в родилните зали на 38 многопрофилни и специализирани болници. За всички пробовземания беше подписано информирано съгласие от родилките, в качеството им на законни представители на донорите (новородените). Всички проби от остатъчна УК бяха събрани с помощта на набор за пробовземане на умбиликална кръв и тъкан, модел FP-250, на белгийския производител ADM Care Systems™ BVBA, съдържащ 21 мл антокоагулант (CPD - цитрат-фосфат-декстроза).

Всички единици УК бяха обработени чрез системата Sepax™ 2 (Biosafe, Швейцария), по усъвършенстван протокол NX-322.

Изчислено бе, че **извадката е представителна за България и обхваща 4,8 – 5% от общия брой криосъхранявани еУК от български донори до момента**. В потвърждение на тезата, че обемът на извадката удовлетворява изследователските нужди, по-долу са представени относителните дялове на грешката, която може да се очаква, с оглед обема на извадката:

*Таблица 1. Размер на грешката при извадка n=721 проби*

<b>Дял от извадката:</b>	<b>Максимално допустим размер на грешката:</b>	<b>Интервал:</b>
<b>5%</b>	<b>1.6%</b>	<b>от 3.4% до 6.6%</b>
<b>10%</b>	<b>2.1%</b>	<b>от 7.9% до 12.1%</b>
<b>15%</b>	<b>2.5%</b>	<b>от 12.5% до 17.5%</b>
<b>30%</b>	<b>3.3%</b>	<b>от 26.7% до 33.3%</b>
<b>50%</b>	<b>3.6%</b>	<b>от 46.4% до 53.6%</b>

Обект на проучването по задача 3 са данните от анонимна анкета, сред 976 избрали частното („семејното“) банкиране жени.

Анкетата беше проведена в периода, между юли 2014 г. и април 2016 г., с цел да представи демографския профил, степента на информираност и мотивацията за избор на съхранилите умбиликална кръв родилки. Включените в анкетата въпроси са сходни с въпросите, използвани в други подобни проучвания и отразяват емпирично добити впечатления за интересите, страховете и очакванията на българските бременни, във връзка с темата. За оценка бяха квалифицирани 721 (73,9%) анкети. За индикативна оценка на отношението и информираността на акушер-гинеколозите и без претенцията за представителност и всеобхватност, бяха поканени 102-ма акушер-гинеколози, като 69 (67,7%) от тях предоставиха попълнени анкетни листове. Доколкото липсваше пряк контакт между изследователския екип и анкетираните, считаме, че няма причина за девиация (bias) на резултатите, поради участие на самите изследователи.

### **Провеждане и организация на проучването:**

Изследователският проект бе инициран от дисертанта през м. декември 2014 г., като първоначалната идея беше, в проучването да бъдат включени възможно повече от 8-те лицензирани към този момент биобанки за УК. Още в самото начало, екипът се сблъска с една основна трудност: Оказа се, че повечето от банките за УК не желаят или не са в състояние да предоставят данни за биологичните характеристики на обработените и криоконсервирани от тях проби. От друга страна, беше потвърдено, че протоколите за пробовзимане и обработка на умбиликалната кръв са стандартизирани и унифицирани до голяма степен, а болшинството (около 90%) от взиманите проби биват обработвани чрез автоматизирани затворени системи от типа на Sepax<sup>®</sup> (Biosafe) и AutoXpress<sup>®</sup> (AXP<sup>®</sup>) (Cesca Therapeutics, USA), за които намерихме сходни показатели за ефективност в литературата. Това позволи, при оформяне на извадката да се ограничим с проби, за които има достъпни и достатъчни по вид и количество данни, без голям риск от изкривяване на резултатите.

По отношение на проучването за информираността и нагласите, първоначалната идея беше да се насочим към структурирано анкетиране на фокусни групи от различни по демографски характеристики прослойки сред младите жени и бременните, по примера на повечето изследователски екипи от други страни. Стартирахме пилотно

проучване и още в началото установихме, че степента на информираност е извънредно ниска извън няколкото големи града, а също така и по отношение на съществуването и дейността на единствената българска обществена банка за УК. Предвид факта, че моделът на развитие у нас се различава съществено от този в повечето (европейски) държави, счетохме, че би било по-интересно да оценим влиянието на съществуващия модел на развитие и евентуално да покажем разликата със ситуацията в други държави, където от години преобладава алтруистичното банкиране на УК в донорски банки. Поради това, насочихме вниманието си към групата на бременните и родилките, които вече са избрали модела на частно банкиране. Отчетохме обстоятелството, че тази група жени е най-силно експонирана на информационно въздействие от страна на биобанките, което създава добра възможност за сравнения с установеното в други държави. Интервютата бяха провеждани непосредствено след сключване на договор за съхранение в частна банка.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За дескриптивен анализ на резерва от единици умбиликална кръв в частни банки беше използван методът на **срезовото ретроспективно проучване**. Изследваните величини бяха разпределени условно в 4 панела:

А) „**Логистичен**“ **панел**, представящ данните за час на пробовзимането [= час на раждането, (h)] и общо транспортно време в часове ( $T_{total}$ );

Б) „**Лабораторен**“ **панел**, с 2 подразделения:

- **биологични показатели, преди обработка**: обем на пробата (V) в милилитри (мл); хематокрит след редукция на обема (HCT) в %; брой мононуклеари преди обработка  $\times 10^8$  ( $MNC_{pre} \times 10^8$ ); общ брой на ядросъдържащите клетки преди обработка  $\times 10^8$  ( $TNC_{pre} \times 10^8$ )

- **биологични показатели след обработка:** брой мононуклеари след обработка  $\times 10^8$  ( $MNC_{post} \times 10^8$ ); общ брой на ядросъдържащите клетки след обработка  $\times 10^8$  ( $TNC_{post} \times 10^8$ ); брой на експресиращите CD34 (CD34+) клетки; жизненост на CD34+ клетките в %; жизненост на CD45+ клетките в %.

В) „Неонателен“ панел, включващ: вид раждане (per vias naturales или планово, чрез sectio); гестационен срок на бременността при раждането (г.с.); тегло на новороденото в грамове (g); дължина на новороденото в сантиметри (cm); оценка на общото състояние на новороденото (д = добро, п = приемливо, л = лошо).

При изследване на информираността и нагласите на родилките и акушер-гинеколозите беше използван анкетният метод (структурирано интервю, с въпроси и отговори, тип multiple choice).

### **Статистическа обработка на данните:**

3.1. Първична обработка на информацията и подготовка на данните за анализ  
Събраните изходни данни за пробите бяха експортирани в пакета за статистическа обработка **IBM SPSS Statistics 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences)**.

3.2. Използваните методи за статистически анализ включват:

3.2.1. Методи за дескриптивен анализ

3.2.2. Методи за статистическа проверка на хипотези (СПХ), съответно:

Параметрични тестове: **Т-тестът** за две независими извадки (Independent Samples T-Test), при проверка за равенство на две средни при нормално разпределение; **Еднофакторният дисперсионен анализ (Oneway ANOVA)**: за независими извадки, при проверка за равенство на две средни стойности.

Непараметрични тестове: **Методът на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov)**, за проверка за нормалност на разпределение; **Методът хи-квадрат (Chi-square test)**, при търсене на връзка между качествени променливи; **Тестът на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis Test)**, при сравнение на средните на количествени променливи, които нямат нормално разпределение –

3.2.3. Методи за корелационен анализ: **Регресионният анализ**, при търсене и доказване на зависимост между дадени количествени променливи, за установяване на адекватност на модела, корелационен коефициент и коефициент на детерминация.

**За критично ниво на статистическа значимост, използвано при проучването беше възприето  $P(\alpha) = 0,05$ .** Съответно на това, при интерпретацията на резултатите се посочва наличие на връзка или закономерност тогава, когато стойността  $p < 0,05$ .

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 4.1. Резултати от дескриптивния анализ

1. **Транспортно време:** Добре известно е, че жизнеността на клетките, както и тяхната способност да реконституират костния мозък на реципиента при трансплантация се влияят от продължителността на времето, от раждане и пробовзимане, до криоконсервирането на пробата в Дюаров съд, при температури под  $-150^{\circ}\text{C}$ . Поради това, времевият прозорец е силно ограничен и международно възприетите стандарти (NetCord-FACT, AABB) препоръчват, това време да е не повече от 24 часа за публичните банки. Частните банки за УК, някои от които събират проби от множество държави, но обработват и съхраняват на едно ли две места, ограничават допустимия времеви прозорец, до 72 часа. Нашето проучване установи следните резултати:

Таблица 2: Транспортно време в часове ( $T_{total}$ )

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	721
Средна стойност	$\bar{X}$	$T_{total} = 34,1 \text{ ч}$
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	38,3%
Доверителен интервал за $T_{total}$ (95%)		$T_{total} = (33,1 \text{ ч} \leftrightarrow 35,1 \text{ ч})$
25-ти персентил	$P_{25}$	$T_{total} \leq 25,2 \text{ ч}$
50-ти персентил (медиана)	$P_{50}$	$T_{total} \leq 28,6 \text{ ч}$
75-ти персентил	$P_{75}$	$T_{total} \leq 43,2 \text{ ч}$

Установеното средно транспортно време е 34,1 часа (CI=95%, 33,1 ↔ 35,1 часа). Медианата (или 50-тия персентил) е 28,6 – т.е., за половината от взетите проби транспортното време е било в рамките на 28,6 часа, докато в 75% от случаите е било не по-голямо от 43,2 часа. Извадката е нееднородна, а модата е двумодална, което може да бъде обяснено с разликата между дневни и нощни раждания (пробовзимания), както и със съботно-неделните раждания. При всички тях се наблюдава удължено общо време за транспорт.

Таблица 3: Транспортно време в часове – разпределение по интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
$T_{total} \leq 27$ ч	291	40,4	40,4
$T_{total} = (27,1$ ч ↔ 38 ч)	200	27,7	68,1
$T_{total} = (38,1$ ч ↔ 49 ч)	140	19,4	87,5
$T_{total} = (49,1$ ч ↔ 60 ч)	58	8,0	95,6
$T_{total} = (60,1$ ч ↔ 72 ч)	24	3,3	98,9
$T_{total} > 72$ ч	8	1,1	100
Общо	721	100	-

Данните показват, че най-често (40,4%) времевият прозорец е в рамките на 27 часа. При 68% от случаите транспортното времето не надвишава 38 часа, докато близо 88% от пробите имат транспортно време до 49 часа. При едва 1.1% допустимият от гледна точка на стандартите времеви прозорец е бил нарушен ( $T > 72$  часа), което

би било евентуален проблем при отпускане на тези проби за терапевтично приложение.

**2. Обем на взетата умбиликална кръв, преди обработка ( $V_{pre}$ ):** Корелацията между обема на взетата умбиликална кръв от една страна и клетъчното съдържание, както и времето за постигане на хемопоетична реконституция, от друга страна, е добре известна. По тази причина, обемът на умбиликалната кръв преди обработка е един от стандартните показатели, които биват отчитани и предоставяни от банките на клиничните центрове. **Обемът на взетата УК е и показателят, който в най-голяма степен зависи от квалификацията и опита на пробовзимащия медицински специалист.** У нас, този показател е сред малкото показатели, които подлежат на задължително съобщаване, на контролиращата специализирана институция (ИАТ). За обема на взетите проби, установихме следните резултати:

*Таблица 4: Обем умбиликална кръв при пробовзимането*

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	713
Средна стойност	$\bar{X}$	$V_{pre} = 95,4$ мл
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	32,2%
Доверителен интервал за V (95%)		$V_{pre} = (93,1 \text{ мл} \leftrightarrow 97,6 \text{ мл})$
25-ти персентил	$P_{25}$	$V_{pre} \leq 72,7$ мл
50-ти персентил (медиана)	$P_{50}$	$V_{pre} \leq 92,0$ мл
75-ти персентил	$P_{75}$	$V_{pre} \leq 113,5$ мл

Средният обем умбиликална кръв за проучваната извадка е **95,4 мл (CI=95%, 93,1  $\leftrightarrow$  97,6 мл)**. Медианата (или 50-тия персентил) е 92,0 мл, т.е. половината от пробите имат обем до 92 мл. Коефициентът на вариация е 32,2%, което означава, че извадката е нееднородна. Емпиричният опит показва, че въпреки наличието на

стандартни алгоритми за пробовзимане, **обемът на УК варира в широки граници и зависи от множество фактори**, като най-важните от практическа гледна точка са:

- наличие на пре-и интрапартално усложнение, причинило загуба на кръв (напр. кръвотечение при placenta praevia или вследствие на abruptio placentae) и други майчини фактори
- неонатални (физиологични) фактори, като тегло и ръст на новородоенното;
- използваната техника на пробовзимане (in utero vs. ex utero);
- уменията и сръчността на пробовзимащия;
- набора за пробовзимане (напр. по-голям или по-малък кръвен сак, по-дълги или по-къси маркучи).

При всички случаи, **принципът по отношение на обема на взетата УК е „колкото повече, толкова по-добре“**. Поради това, интерес представлява преди всичко делът на пробите с достатъчно голям обем, преди обработката:

Таблица 5: Обем на умбиликалната кръв – разпределение по интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
Vpre = (24 мл ↔ 64 мл)	100	14,0	14,0
Vpre = (64.1 мл ↔ 104 мл)	356	49,9	64,0
Vpre = (104.1 мл ↔ 144 мл)	210	29,5	93,4
Vpre = (144.1 мл ↔ 184 мл)	39	5,5	98,9
Vpre = (184.1 мл ↔ 224 мл)	8	1,1	100,0
Общо	713	100	-



За достатъчни по обем, в практиката често се приемат пробите с поне 60 мл първоначален обем. Данните показват, че **84% от съхраняваните проби отговарят на това изискване.**

**3. Стойност на хематокрита, след редукция на обема:** Еритроцитните остатъци в обработените единици УК имат добре установено цитотоксично влияние върху жизнеспособността на примитивните клетки, като този ефект се проявява най-отчетливо, по време на замразяването или при размразяване. При алогенна трансплантация, отстраняването на еритроцитите повишава имунната толерантност към донорската умбиликална кръв, доколкото може да има кръвнорупова несъвместимост между присадка и реципиент. По тази причина **се предпочитат единици с ниско ниво на хематокрит, като препоръчителният праг при алогенна трансплантация е 40%.** В алогенния контекст, по-високите стойности на хематокрита, могат да бъдат компенсирани от по-висок праг (%) жизненост за CD34+ (напр.  $\geq 90\%$ ). Ние получихме следните резултати:

Таблица 6: Хематокрит – интервали

Интервал	брой	Относителен дял	Кумулативна честота
0% ↔ 40 %	671	94,2%	94,2%
> 40%	41	5,8%	100,0%
Общо	712	100%	-

Фиг.1 : Хематокрит, след редукция на обема



Данните показват, че **преобладаващият брой изследвани проби (94,2 %) биха покрили условното изискване при (близкородствена) алогенна трансплантация, за**

стойност на хематокрита до 40%. Този резултат е сравним с резултатите публикувани от други автори.

**4. Брой мононуклеари преди обработка ( $MNC_{pre}$ ):** Мононуклеарите представляват частта от общия брой съдържащи ядро клетки (total nucleated cell count / TNC), след като изключване на полиморфноядрената фракция (неутрофилите). В зависимост от метода на обработка, полиморфноядрената фракция може или не, да присъства в крайния препарат за криоконсервация. Установен факт е, че броят на MNC корелира с броя на приеманите като най-близък сурогатен маркер за стволовите клетки CD34+. Освен това, сравняването на  $MNC_{pre}$  и  $MNC_{post}$  дава възможност за оценка на ефективността от обработката на кръвния препарат. Нашето проучване установи следните резултати:

Таблица 7: Мононуклеари преди обработка ( $MNC_{pre}$ )

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	$MNC_{pre} = 4,2 \times 10^8$
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	55.9%
Доверителен интервал за $MNC_{pre}$ (95%)		$MNC_{pre} = (4,0 \leftrightarrow 4,4 \times 10^8)$
25-ти персентил	$P_{25}$	$MNC_{pre} \leq 2,6 \times 10^8$
50-ти персентил	$P_{50}$	$MNC_{pre} \leq 3,8 \times 10^8$
75-ти персентил	$P_{75}$	$MNC_{pre} \leq 5,3 \times 10^8$

Установеният среден брой мононуклеари за извадката е  $4,2 \times 10^8$ . (CI=95%,  $4,0 \times 10^8 \leftrightarrow 4,4 \times 10^8$ ). Коефициентът на вариация е над 50%, което означава, че извадката е силно нееднородна.

Таблица 8:  $MNC_{pre}$  – разпределение по интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
$MNC_{pre} = (0,35 \leftrightarrow 5,0 \times 10^8)$	509	71,5	71,5
$MNC_{pre} = (5,1 \leftrightarrow 10,0 \times 10^8)$	188	26,4	97,9
$MNC_{pre} = (10,1 \leftrightarrow 14,0 \times 10^8)$	10	1,4	99,3
$MNC_{pre} = (14,1 \leftrightarrow 24,0 \times 10^8)$	5	0,7	100,0
Общо	712	100	-

Данните показват значителен дял на потенциално годните за терапевтично приложение проби, с високо съдържание на (делът на еУК с  $MNC_{pre} \geq 5,0 \times 10^8$  е 28,5%).

**5. Общ брой на съдържащите ядро клетки, преди обработка ( $TNC_{pre}$ ):**  
Общият брой на ядрените клетки (TNC) се възприема, като един от най-подходящите критерии за оценка на единиците УК. Подобно на ситуацията при мононуклеарите, броят на TNC се влияе от процеса на обработка, поради което, меродавният критерий за терапевтична пригодност на еУК е броят на TNC след обработка на пробите, непосредствено преди криоконсервиране. Сравняването на  $TNC_{pre}$  и  $TNC_{post}$  дава възможност за оценка на ефективността от обработката на кръвния препарат. Ние установихме следните резултати:

Таблица 9: Общ брой ядрени клетки преди обработка ( $TNC_{pre}$ )

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	$TNC_{pre} = 10,0 \times 10^8$
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	58,2%
Доверителен интервал за $TNC_{pre}$ (95%)		$TNC_{pre} = (9,6 \leftrightarrow 10,5 \times 10^8)$
25-ти перцентил	$P_{25}$	$TNC_{pre} \leq 6,2 \times 10^8$
50-ти перцентил	$P_{50}$	$TNC_{pre} \leq 8,9 \times 10^8$
75-ти перцентил	$P_{75}$	$TNC_{pre} \leq 12,8 \times 10^8$

За средната стойност на общия брой ядрени клетки преди обработка намерихме, че е  $10,0 \times 10^8$  (CI=95%,  $9,6 \times 10^8 \leftrightarrow 10,5 \times 10^8$ ). Медианата (или 50-тия перцентил) е  $8,9 \times 10^8$ , т.е. преди обработка, половината от пробите са съдържали до  $8,9 \times 10^8$  ядрени клетки. При 50% от пробите  $TNC_{pre} \geq 8,9 \times 10^8$ , което приблизително съответства на средния % проби, които биват приети за обработка от донорските банки. Коефициентът на вариация е над 50%, което означава, че извадката е силно нееднородна.

Таблица 10:  $TNC_{pre}$  – разпределение по интервали

Разпределение по нтервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
$TNC_{pre} = (0,5 \leftrightarrow 15 \times 10^8)$	614	86,2	86,2
$TNC_{pre} = (15,1 \leftrightarrow 30 \times 10^8)$	93	13,1	99,3
$TNC_{pre} = (30,1 \leftrightarrow 72.9 \times 10^8)$	5	0,7	100,0
Общо	712	100	-

Предвид честотата си от 0,7%, 5-те проби с  $TNC_{pre} \geq 30,1 \times 10^8$  могат да бъдат разглеждани, като **извънредни случаи (outliers)**. Съпоставката с обема и теглото на тези проби преди обработка показва съответствие, доколкото тези показатели също се отличаваха със значително по-високи стойности, в сравнение с останалите проби.

**6. Брой мононуклеари след обработка ( $MNC_{post}$ ):** Броят на мононуклеарите след обработка е важен критерий за клетъчното съдържание и потенциалната терапевтична пригодност на обработените единици УК. Напоследък, някои автори дори предлагат клетъчният брой на  $MNC_{post}$  да измести  $TNC_{post}$ , като основен критерий и минимален праг (cut-off point) за терапевтичната годност на еУК. Това важи особено в онези случаи, при които самият метод на обработка отстранява полиморфноядрената фракция и не може да бъде установен общ брой на ядрените клетки ( $TNC_{post}$ ). Използваните у нас методи позволяват определянето на  $TNC_{pre/post}$ , като това важи за болшинството от съхраняваните еУК от български донори. Ние установихме следните стойности за  $MNC_{post}$ :

Таблица 11: Мононуклеари след обработка ( $MNC_{post}$ )

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	$MNC_{post} = 3,7 \times 10^8$
Коефициент на	$V_{\sigma}$	52,4%

вариация		
Доверителен интервал за $MNC_{post}$ (95%)		$MNC_{post}=(3,6 \leftrightarrow 3,9 \times 10^8)$
25-ти персентил	$P_{25}$	$MNC_{post} \leq 2,4 \times 10^8$
50-ти персентил	$P_{50}$	$MNC_{post} \leq 3,4 \times 10^8$
75-ти персентил	$P_{75}$	$MNC_{post} \leq 4,8 \times 10^8$

Установеният среден брой на моноклеарите след обработка е  $3,7 \times 10^8$  (CI=95%,  $3,6 \leftrightarrow 3,9 \times 10^8$ ). Медианата (или 50-тия персентил) е  $3,4 \times 10^8$  т.е., при половината от пробите моноклеарите са до  $3,4 \times 10^8$ . При 25% от случаите се очаква стойност на моноклеарите над  $4,8 \times 10^8$ , което приблизително съответства на средния % проби, които биват криоконсервирани в донорските банки. Коефициентът на вариация е над 50%, което означава, че извадката е силно нееднородна.

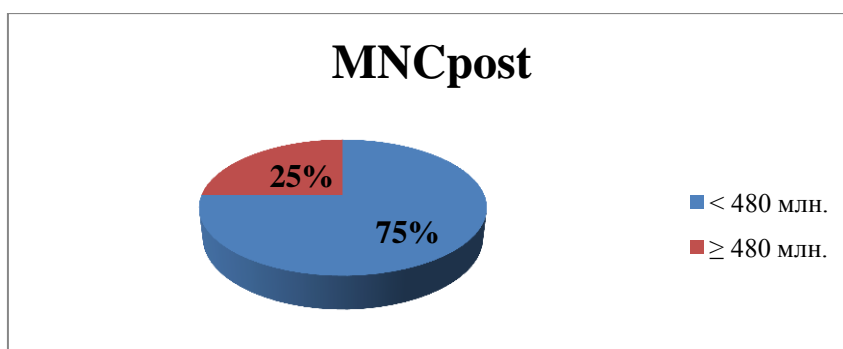
Таблица 12:  $MNC_{post}$  – разпределение по интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
$MNC_{post} = (0.38 \leftrightarrow 5 \times 10^8)$	568	79,8	79,8
$MNC_{post} = (5.1 \leftrightarrow 10 \times 10^8)$	141	19,8	99,6
$MNC_{post} = (10.1 \leftrightarrow 14 \times 10^8)$	2	0,3	99,9

$MNC_{post} = (14.1 \leftrightarrow 24 \times 10^8)$	1	0,1	100,0
Общо	712	100	-

Данните показват, че при **25%** от изследваните еУК, броят на мононуклеарите след обработка надхвърля  $4,8 \times 10^8$ , при предложен от някои проучватели минимален праг от  $4,05 \times 10^8$ .

Фиг.2: Клетъчен брой за мононуклеарите, след обработка



**7. Общ брой на съдържащите ядро клетки след обработка (TNCpost):** Общият брой на ядрените клетки след обработка, **категорично е считан за най-меродавният показател за терапевтичната пригодност на единиците умбиликална кръв**, разбира се, наред с колонигенния потенциал на пробите и със степента на тъканна съвместимост (само при алогенно приложение). Поради това, наред с обема на взетата кръв, практически 100% от банките отчитат и предоставят този показател на клиничните центрове, когато става въпрос за предварителна оценка на дадена проба. **Учудващ регулаторен пропуск е, че у нас, данните за TNCpost не се събират и анализират от контролиращата специализирана институция.** Многобройни изследвания доказват предиктивната стойност на TNCpost по отношение постигането на хемопоеична реконституция. Важно обстоятелство е, че в исторически план се наблюдава динамика в условно определяните, като минимално необходими клетъчни дози за ХСК-трансплантация. До 2000-та година и малко след това се посочваше брой от минимум  $1,5 \times 10^7/\text{кг}$  телесна маса на реципиента. Впоследствие, минимално препоръчителните дози нараснаха до  $2,0 - 2,5 \times 10^7/\text{кг}$ , каквито към момента са и препоръките на Световната асоциация по костно-мозъчно донорство. При това, клетъчната доза при алогенните хемопоеични трансплантации на УК следва да бъде съобразена и със степента на тъканна съвместимост, като в общия случай, по-малката

степен на HLA-съвместимост следва да бъде компенсирана от по-висока клетъчна доза: напр.  $3,0 - 5,0 \times 10^7/\text{кг}$  телесно тегло на реципиента при степен на антигенно сходство 4 от 6 групи. При нехематологичните клинични индикации, обикновено клетъчните дози са 2-3 пъти по ниски, от порядъка на  $1 \times 10^7/\text{кг}$ . Ние намерихме следните резултати за  $\text{TNC}_{\text{post}}$ :

Таблица 13: Общ брой ядрени клетки след обработка ( $\text{TNC}_{\text{post}}$ )

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	$\text{TNC}_{\text{post}} = 8,9 \times 10^8$
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	58,3%
Доверителен интервал за $\text{TNC}_{\text{post}}$ (95%)		$\text{TNC}_{\text{post}} = (8,5 \leftrightarrow 9,3 \times 10^8)$
25-ти персентил	$P_{25}$	$\text{TNC}_{\text{post}} \leq 5,5 \times 10^8$
50-ти персентил (медиана)	$P_{50}$	$\text{TNC}_{\text{post}} \leq 7,9 \times 10^8$
75-ти персентил	$P_{75}$	$\text{TNC}_{\text{post}} \leq 11,5 \times 10^8$

Установената средна стойност за общия брой ядрени клетки след обработка е  $8,9 \times 10^8$  (CI=95%,  $8,5 \leftrightarrow 9,3 \times 10^8$ ). Тази стойност ни дава възможност да изчислим степента на възстановяване на TNC след обработка ( $\text{TNC}_{\text{recovery}}$ ), която е изключително важен параметър за оценка на ефективността на обработката и показва,



какъв % клетки загиват при обработката на пробите. Изчислението на  $TNC_{\text{recovery}}$  става по формулата:

$$TNC_{\text{recovery}} = \frac{TNC_{\text{post}}}{TNC_{\text{pre}}} \times 100$$

**За изследваните единици УК,  $TNC_{\text{recovery}} = 89\%$  (+/-0,4%).** Този показател е сравним и надвишава макар и с малко резултите на други изследователи. Допускаме, че установената висока ефективност на клетъчното сепариране се дължи преди всичко на усъвършенствания протокол (NX-322) за работа със системата Sepax – 2, както и на стриктното спазване на стандартните оперативни процедури при обработка на пробите. С вероятност от 95% може да се твърди, че средния брой за всички проби ще варира в границите от  $8,5 - 9,3 \times 10^8$ . Медианата (или 50-тия персентил) е  $7,9 \times 10^8$ , което означава, че **значителна част (половината) от единиците УК, след обработка и преди замразяване съдържат  $> 7,9 \times 10^8$ .** Тази стойност е близо до все още валидните от за много от обществените банки минимални прагове (cut off points) от  $8,0 \times 10^8$ . От друга страна, само около 25% от съхраняваните от частните банки еУК отговарят на по-актуалния минимален праг от  $10,0 \times 10^8$ . Коефициентът на вариация е над 50%, което означава, че извадката е силно нееднородна, съответно на практическите ни наблюдения.

Фиг.3:  $TNC_{\text{post}}$

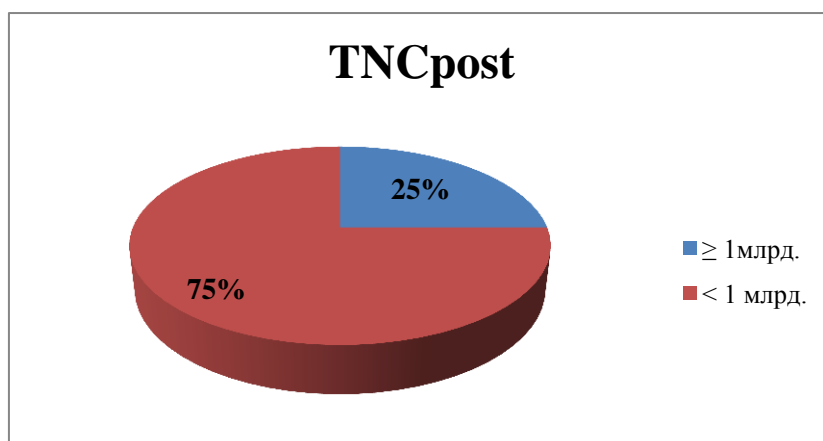


Таблица 14:  $TNC_{\text{post}}$  – разпределение по интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
$TNC_{post} = (0,6 \leftrightarrow 14)$	612	86,0	86,0
$TNC_{post} = (14,1 \leftrightarrow 28 \times 10^8)$	97	13,6	99,3
$TNC_{post} = (30,1 \leftrightarrow 68,1 \times 10^8)$	3	0,4	100,0
Общо	712	100	-

Данните показват, че с оглед на възможността за достатъчна клетъчна доза, **само около 14 % от съхраняваните еУК, биха били подходящи за хемопоестично реконституиране на възрастен индивид, с тегло 60 – 70 кг.** Този резултат съответства на факта, че болшинството от ХСК-трансплантациите с умбиликална кръв до момента са правени при педиатрични пациенти, като много от трансплантираните с УК възрастни са били използвани т.нар. „двойни присадки“ (double cord), т.е. две единици УК.

Предвид честотата си от 0,4%, 3-те проби с  $TNC_{post} \geq 30,1 \times 10^8$  могат да бъдат разглеждани, като **извънредни случаи (outliers)**. Съпоставката с обема, теглото и MNC при тези проби показва съответствие, доколкото тези показатели също се отличаваха със значително по-високи стойности, в сравнение с останалите проби.

**8. Брой на експресиращите CD34 клетки (CD34+):** Субпопулацията на CD34+ се счита за най-близък сурогатен маркер за наличието на стволови и прогениторни клетки. Едва 1- 2% от всички клетки в умбиликалната кръв експресират CD34 антигена, като за не повече от 15 - 20% от тях се счита, че са незрели, мултипотентни клетки. От тази гледна точка, е целесъобразно идентифицирането на CD34+ субпопулацията, едва след обработката. В клиничен аспект, за минималната клетъчна доза се наблюдава подобна динамика, както при клетъчната доза на  $TNC_{post}$ : Вместо първоначално препоръчваните дози, от порядъка на  $1,5 - 1,7 \times 10^5/\text{кг}$  тегло на

реципиента (до 2005 – 2008 г.), **напоследък се препоръчват минимални клетъчни дози от  $2,0 - 4,0 \times 10^4/\text{кг}$** . Някои от акредитиращите организации, напр. *Американската агенция за лекарствата и храните* (FDA) поставят минимални прагове за клетъчно съдържание на CD34+, за публичните банки. Например, **препоръчителният минимален праг на FDA е  $\geq 12,5 \times 10^5$** . Ние установихме следните резултати:

*Таблица 15: Експресиращи клъстера на диференциация CD34, след обработка (CD34+):*

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	CD34+ = $21 \times 10^5$
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	100%
Доверителен интервал за CD34+ (95%)		CD34+ = ( $19 \times 10^5 \leftrightarrow 22 \times 10^5$ )
25-ти персентил	$P_{25}$	CD34+ $\leq 7,3 \times 10^5$
50-ти персентил	$P_{50}$	CD34+ $\leq 14 \times 10^5$
75-ти персентил	$P_{75}$	CD34+ $\leq 26 \times 10^5$

**Средното съдържание на експресиращи CD34+ за пробите в извадката е  $21 \times 10^5$  (CI=95%,  $19 \times 10^5 \leftrightarrow 22 \times 10^5$ ).** Над 50% от пробите отговарят на акредитационните изисквания за минимално съдържание на CD34+, за публичните банки. Коефициентът на вариация е над 50%, което означава, че извадката е силно нееднородна.

*Фиг.4: CD34+post*

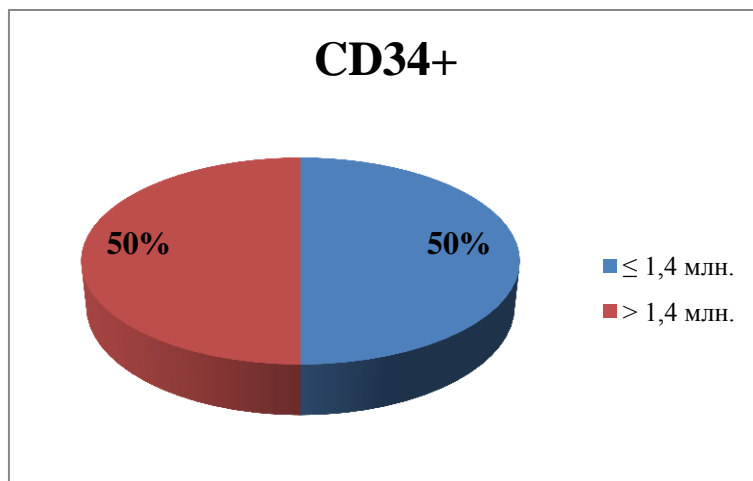


Таблица 16: CD34+ разпределение по интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
CD34+ = (0,45 ↔ 32 x 10 <sup>5</sup> )	567	79,6	79,6
CD34+ = (32,1 x 10 <sup>5</sup> ↔ 64 x 10 <sup>5</sup> )	120	16,9	96,5
CD34+ = (64,1 x 10 <sup>5</sup> ↔ 96 x 10 <sup>5</sup> )	16	2,2	98,7
CD34+ = (96,1 x 10 <sup>5</sup> ↔ 128 x 10 <sup>5</sup> )	3	0,4	99,2
CD34+ = (128,1 x 10 <sup>5</sup> ↔ 159 x 10 <sup>5</sup> )	6	0,8	100,0

Общо	712	100	-
------	-----	-----	---

Предвид честотата си от 0,8 %, 6-те проби с  $CD34+ \geq 128,1 \times 10^5$  могат да бъдат разглеждани, като **извънредни случаи (outliers)**. Съпоставката с останалите показатели при тези проби показва съответствие, доколкото тези показатели също се отличаваха със значително по-високи стойности, в сравнение с останалите проби.

**9. Жизнеспособност на експресиращите CD34 антигена клетки (CD34+):** Както броят, така и виталността на CD34+ субпопулацията се считат за важни предиктивни фактори, за скоростта на хемопоетичната реконституция и за преживяемостта след трансплантация. Определянето на клетъчната жизнеспособност се извършва чрез съчетание на културелни и флоуцитометрични методи и за извършването му, стандартно са необходими 14 дни. При това, броят на установените колонии (особено от типовете GFU-GM и GFU-GEMM) корелира положително с прогениторния потенциал на умбиликалната кръв. Международно възприетите стандарти на NetCord-FACT изискват минимална жизнеспособност за CD34+ от 80%. Ние установихме следните стойности:

Таблица 17; Жизненост на CD34+

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	98,5 %
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	3,9
Доверителен интервал, 95%		98,2 ↔ 98,7
25-ти персентил	$P_{25}$	98,0 %
50-ти персентил (медиана)	$P_{50}$	99,0 %
75-ти персентил	$P_{75}$	99,9 %

Почти всички изчислени стойности се намират близо до 99%, като средният процент за извадката е 98.5% (CI=95%, 98,2 ↔ 98,7). Резултатите са сравними с тези на други изследователи, които намират 98,2% жизнеспособност при единици УК, обработени в обществената банка. Коефициентът на вариация е 3,9%, което означава, че извадката е еднородна.

Таблица 18: Жизненост на CD34+ след обработка (%) – интервали

Разпределение по интервали:	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
≤ 80 %	2	0,3 %	0,3 %
80,1 % ↔ 95 %	40	5,6 %	5,9 %
95,1 % ↔ 99 %	333	46,8 %	52,7 %
99,1 % ↔ 100 %	337	47,3 %	100 %
Общо	712	100%	-

**10. Жизненост на експресиращите CD45 клетки (CD45+):** Популацията на CD45+ включва както Т-, В-лимфоцити и NK-клетки в различен стадий на зрялост, така и CD34 експресиращите стволови и прогениторни клетки. Поради това, жизнеспособността на CD45+ охарактеризира общия брой ядрени клетки в пробата. По правило се очаква, виталитетът на CD45+ да бъде малко по-нисък от този на CD34+. Въпреки това, стандартите на NetCord-FACT изискват същия минимален праг от 80%.

Таблица 19: Жизненост на CD45 експресиращите клетки (CD45+)

Характеристика:	Символ:	Стойност:
Проучени проби	N	712
Средна стойност	$\bar{X}$	90,7
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	8,9%

Доверителен интервал, 95%		90,1 ↔ 91,3
25-ти персентил	$P_{25}$	87,0
50-ти персентил (медиана)	$P_{50}$	93,2
75-ти персентил	$P_{75}$	97,0

Средната стойност за жизнеността на CD45+ е 90,7% (CI=95%, 90,1 ↔ 91,3). При над 75% от изследваните единици УК (след 25-тия персентил) жизнеспособността на CD45+ надвишава изискваната стандартите на NetCord-FACT минимална жизнеспособност за CD45+ от 80%. Коефициентът на вариация е 8,9%, което означава, че извадката е еднородна.

Таблица 20: Жизненост на CD45+: разпределение по интервали

Разпределение по нтервали	N	Относителен дял (%)	Кумулативна честота (%)
55 % ↔ 64 %	6	0,8 %	0,8 %
64,1 % ↔ 73 %	23	3,2 %	4,1 %
73,1 % ↔ 82 %	81	11,4 %	15,4 %
82,1 % ↔ 91 %	174	24,4 %	39,9 %
91,1 % ↔ 99,3 %	428	60,1 %	100,0 %
Общо	712	100 %	-

## 11. Неонатални (физиологични) показатели на донорите:

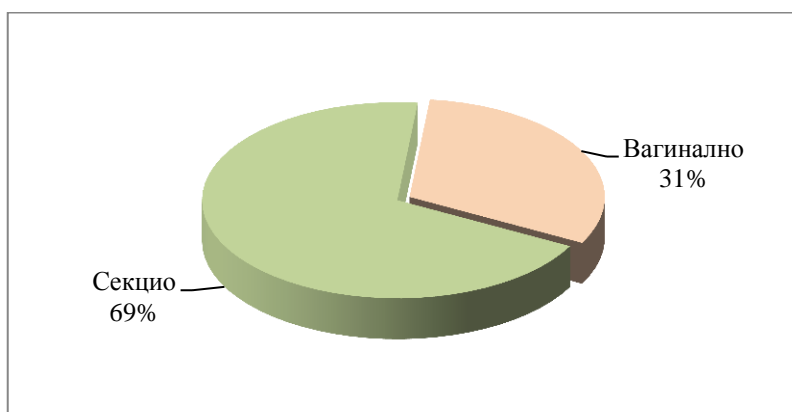
Вид раждане:

Таблица 21: Вид раждане

Характеристика:	N	Относителен дял (%)
Вагинално	222	31,1 %*
Секцио	492	68,9 %*
Общо	714	100 %

\*наличие на статистически значима разлика ( $p < 0.05$ )

Фигура 5: Вид раждане



Разликата в полза на плановите раждания със секцио е очевидна. Според нас, **високият дял на плановите раждания (69 %) може да бъде обяснен с факта, че по-голямата част от пробите бяха взети при раждания в частни акушеро-гинекологични болници, където % на ражданията със секцио принципно е по-висок.**

**Пол:**

Таблица 22: Пол на роденото дете

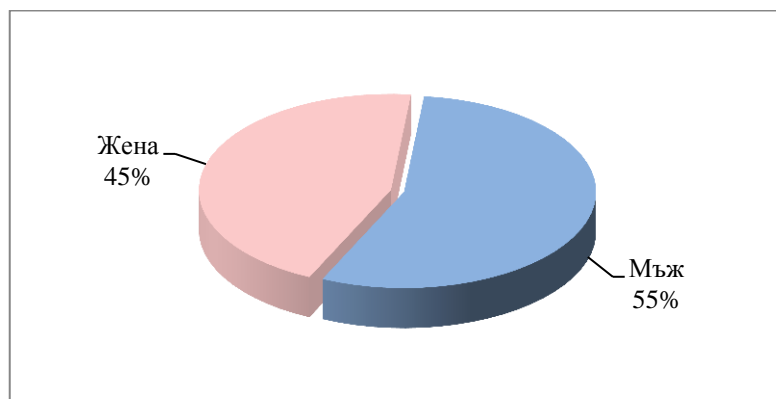
Характеристика:	N	Относителен дял (%)
Мъж	399	55.3%*



Жена	322	44.7%*
Общо	721	100%

\*наличие на статистически значима разлика ( $p<0.05$ )

Фигура 6: Пол



С 95% вероятност, можем да се твърди, че съществува статистически значима разлика, установена чрез СПХ, между съхраненията на умбиликална кръв от новородени момчета и момичетата, като разликата е с около 10 % в полза на момчетата. **Любопитно е, че тази разлика значително надвишава естествения феномен на превес, при раждането на деца от мъжки пол (около 2,5 % разлика за 2016 г.).**

#### Гестационна възраст на новородените:

Таблица 23: Гестационна възраст

Характеристика:		Пол		Общо:
		мъжки	женски	
Брой	N	398	320	718
Средна стойност (г.с.)	$\bar{X}$	38,7	38,8	38,7
Мода (г.с.)	Mo	39	39	39
Коефициент на вариация	$V_{\sigma}$	3,7%	3,4%	3,5%

Доверителен интервал, 95% (г.с.)		38,5 ↔ 38,8	38,6 ↔ 38,9	38,6 ↔ 38,8
25-ти персентил (г.с.)	$P_{25}$	38	38	38
50-ти персентил (г.с.)	$P_{50}$	39	39	39
75-ти персентил (г.с.)	$P_{75}$	40	40	40

С вероятност от 95% може да се твърди, че средната гестационна възраст при раждането за всички разглеждани случаи варира в границите от 38,6 до 38,8 г.с. Коефициентът на вариация е 3,5%, което означава, че извадката е еднородна.

#### Тегло при раждане:

Таблица 24: Тегло

Характеристика:		Пол на детето		Общо:
		мъжки	женски	
Брой	N	397	320	717
Медиана (гр)	Me	3300	3175	3230
Мода (гр)	Mo	3400	2900	3500
Средна стойност (гр)	$\bar{X}$	3256,7*	3146,9*	3207,7
Коефициент на вариация (%)	$V_{\sigma}$	13,8%	14,3%	14,1%
Доверителен интервал, 95% (гр)		3 212,4 ↔ 3 300,9	3 097,7 ↔ 3 196,1	3 174,6 ↔ 3 240,8

25-ти персентил (гр)	$P_{25}$	2970	2900	2910
50-ти персентил (гр)	$P_{50}$	3300	3175	3230
75-ти персентил (гр)	$P_{75}$	3550	3447,5	3500

\*наличие на статистически значима разлика ( $p < 0.05$ )

### Дължина (ръст) при раждане:

Таблица 25: Дължина (см)

Характеристика		Пол		Общо
		мъжки	женски	
Брой	N	396	319	715
Медиана (см)	Me	50	50	50
Мода (см)	Mo	50	50	50
Средна стойност (см)	$\bar{X}$	50.0*	49.3*	49.7
Коефициент на вариация (5)	$V_{\sigma}$	3.5%	4.1%	3.9%
Доверителен интервал, 95% (см)		49.8 ↔ 50.2	49.1 ↔ 49.6	49.6 ↔ 49.8

25-ти персентил (см)	$P_{25}$	49	48	49
50-ти персентил (см)	$P_{50}$	50	50	50
75-ти персентил (см)	$P_{75}$	51	50	51

\*наличие на статистически значима разлика ( $p < 0.05$ )

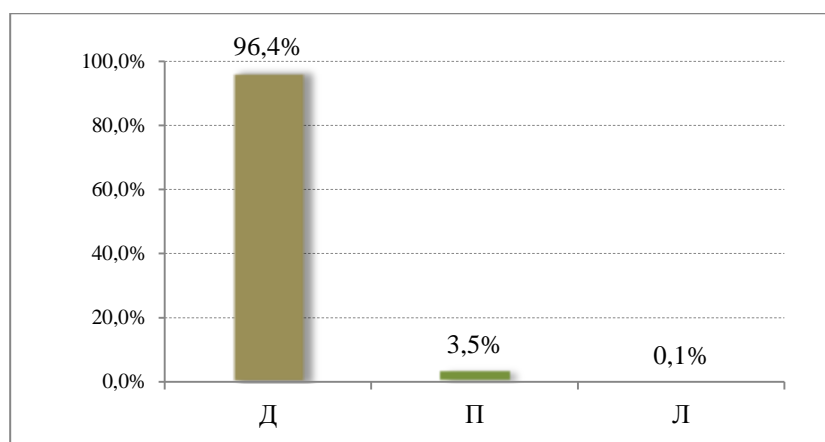
### Общо състояние при раждането:

Таблица 26: Общо състояние

Характеристика:	N	Относителен дял (%)
добро	661	96,4 %*
приемливо	24	3,5 %
лошо	1	0,1 %
Общо	686	100 %

\*наличие на статистически значима разлика ( $p < 0.05$ )

Фигура 7: Общо състояние



## 12. Бактериални замърсявания на пробите с умбиликална кръв:

Въпреки, че данните за бактериалните замърсявания при единиците УК варират в широки граници (между 0 и 48%), повечето изследователи съобщават нива в рамките на 10%, каквато е и находката на екипа от българската публична банка. Нашите резултати са следните: Първичните инокулати са дали положителен резултат (турбидност) при 61 проби, но бактериално замърсяване е потвърдено при 48 проби (6,7 %). От тях са идентифицирани 58 изолата.

Таблица 27: Замърсени бактериално проби

Характеристика	Брой	Относителен дял
Чисти	673	93.3%*
Бактериално замърсени	48	6.7%
Общо	721	100%

При 39 от контаминирани проби, за които е било възможно изолирането на замърсител, е идентифициран по 1 микроорганизъм, докато при 9 проби са установени полимикробни замърсявания. Бактериалните контаминанти и тяхната честота са представени в следната таблица:

Таблица 28: Бактериални контаминанти

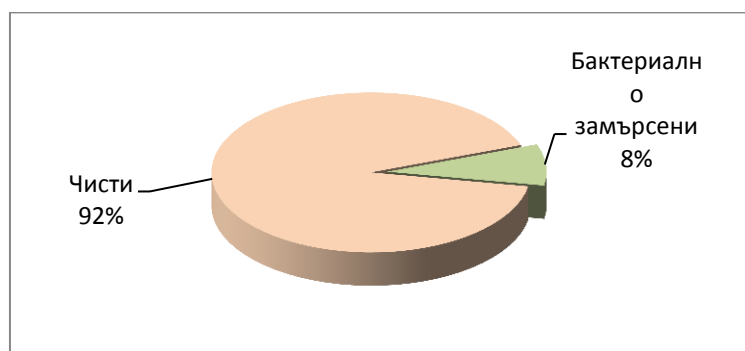
Идентифициран микроорганизъм:	Относителна честота (%) n = брой замърсени проби с този микроорганизъм
<i>Bacteroides uniformis</i>	5,9 % (n=4)
<i>Bacteroides theatiotaomicron</i>	1,5 % (n=1)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1,5 % (n=1)
<i>Bifidobacterium sp</i>	4,4 % (n=3)

<i>Candida albicans</i>	1,5 % (n=1)
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,5 % (n=1)
<i>Eggerthella lenta</i>	1,5 % (n=1)
<i>Enerococcus faecalis</i>	10,3 % (n=7)
<i>Enterococcus faecium</i>	1,5 % (n=1)
<i>Escherichia coli</i>	5,9 % (n=4)
<i>Propionibacterium acnes</i>	8,8 % (n=6)
<i>Propionibacterium granulosum</i>	1,5 % (n=1)
<i>Proteus mirabilis</i>	1,5 % (n=1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,9 % (n=2)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10,3 % (n=7)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	7,4 % (n=5)
<i>Streptococcus agalacticae</i>	8,8 % (n=6)
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2,9 % (n=2)
<i>Streptococcus infantarius</i>	2,9 % (n=2)
<i>Streptococcus mitis</i>	2,9 % (n=2)

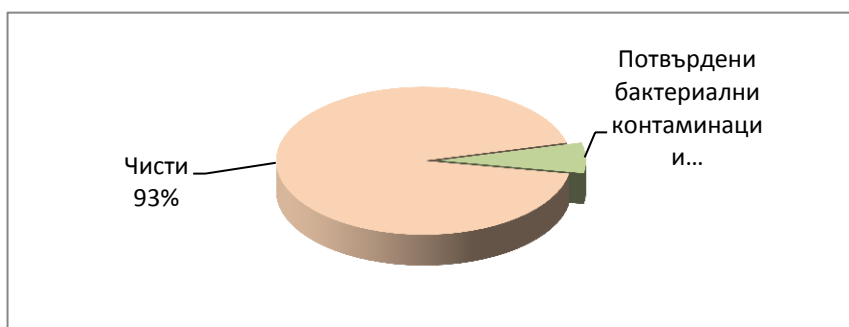
100 % (n=58)

Интерес представлява съпоставката на контаминационния статус, с вида на раждането. Само при 10,4% (n=5) от 48-те замърсени проби, раждането е било планово (секцио), като **преобладаващият брой бактериални контаминации се наблюдава при вагинални раждания [10,4% (n=5) vs. 89,6% (n=43), OR=0,043]**. Идентифицираните микроорганизми при контаминациите, при раждания със секцио са съответно: *S. epidermidis* (n=2) и *Propionibacterium acnes* (n=4). **При контаминациите, при вагинални раждания, идентифицираните микроорганизми са разнообразни, като преобладават представителите на гастроинтестиналната и перинеалната флора.** Установените резултати потвърждават нашите дългогодишни емпирични наблюдения.

Фигура 8: Първично установена турбидност



Фигура 9: Потвърдени бактериални контаминации



Дарените в донорска банка проби от УК, за които бъде открита бактериална контаминация преди

замразяването, обикновено биват унищожавани и не стигат до дългосрочна криоконсервация. Проучените от нас проби са съхранени в частна биобанка и решението за това, дали да бъдат криоконсервирани беше взето по информиран път, след дискусия с родителите на донора. По време на дискусията беше подчертано, че

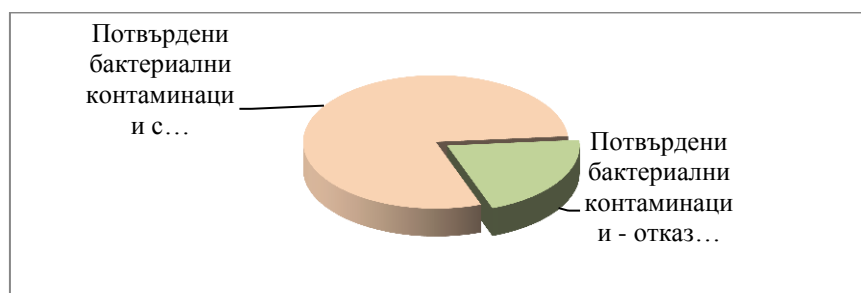
бактериалната контаминация ограничава в значителна степен използваемостта на пробите от УК. Въпреки че бяха надлежно информирани относно контаминационния статус на пробите, близо 4/5 от засегнатите сурогатни донори (родители) предпочетоха да предадат пробите си за дългосрочна криоконсервация. Според нас, този резултат може да бъде обяснен с феномена на „свърхочакване“ по отношение на терапевтични възможности на умбиликалната кръв в бъдеще. Този феномен е подхранван силно от информационните материали на частните банки за УК.

Таблица 29: Желание за съхранение

Характеристика:	N	Относителен дял (%)
Потвърдени бактериални контаминации, с потвърдено желание за криоконсервация	38	79.2*
Потвърдени бактериални контаминации, с отказ от криоконсервация	10	20.8*
Общо	48	100%

\*наличие на статистически значима разлика ( $p < 0.05$ )

Фигура 10: Желание за съхранение



### 13. Серологични резултати от задължителните изследвания на майчината кръв:

Трансплантационният контекст (имуносупресиран реципиент) предполага задължителна стерилност на препаратите от умбиликална кръв. Рискът от вертикално



предаване на вирусни инфекции от родилката е сведен до минимум, доколкото в практиката на банките за умбиликална кръв е въведено *задължително вирусологично изследване на майчината кръв*. Положителните серологични резултати биват верифицирани, чрез полмеразно-верижна реакция за доказване на вирусни нуклеинови киселини (NAT). Съгласно регулаторните изисквания и стандартите за банкиране на умбиликална кръв, банките са задължени да изследват майчината кръв за инфекции или носителство на определени причинители на заразни заболявания, включително вирусите на *HIV I/II*, *HBV*, *HCV*, *HLTV*, *CMV*, *T. pallidum*. Данните за проучваните единици УК са следните:

*Таблица 30: Серология на майчина кръв с потвърждение*

Вирусен причинител	Брой изследвани проби	Брой положителни проби	Относителен дял на положителните проби
Syphilis	721	2	0.3%
HBs-Ag	721	8	1.1%
Anti-HBs	721	35	4.9%
Anti-HBc	721	44	6.1%
Anti-HCV	721	2	0.3%
Anti-HIV	721	0	0.0%

Обичайната практика за пробите, за които бъде потвърдена активна инфекция е, да бъдат блокирани и унищожени, съгласно изискванията за управление на биологични отпадъци.

#### **14. Оценка на потенциалната терапевтичната стойност**

Резултатите от изследването показаха, че при съхраняваните единици умбиликална кръв са налице големи вариации, най-вече по отношение на клетъчното им съдържание. Бяха установени различни фактори от логистично (напр.  $T_{total}$ ), акушерско (напр.  $V_{pre}$ ), лабораторно ( $TNC_{recovery}$ ) и неонатално (физиологично) естество, които влияят върху клетъчното съдържание и жизнеността на клетките. **Терапевтичната годност на**

съхраняваните единици УК, в крайна сметка бива определяна, на базата на няколко показателя, централно място сред които заемат общият брой на съдържащите ядро клетки след обработка (TNCpost) и броят и броят на експресиращите повърхностния антиген CD34 клетки след обработка (CD34+). Тези 2 показателя могат да дадат предварителна представа на клинициста, дали нужната за съответния пациент (реципиент) клетъчна доза може да бъде осигурена. От тази гледна точка е целесъобразно, да бъде извършена оценка за терапевтична пригодност на разглежданата (представителна) извадка, а оттам и на целия пуул от близо 15 000 единици УК, съхранявани към момента в българските семейни банки за умбиликална кръв. Оценката може да бъде направена, като се вземат предвид стъпаловидно нарастващи, условни минимално-изискуеми прагове за клетъчно съдържание и така да бъде определен делът на потенциално годните проби, спрямо различни минимални изискуеми прагове (cut-off points):

- брой и % проби, съдържащи TNC post, над  $2 \times 10^8$ ; над  $3 \times 10^8$ ; над  $4 \times 10^8$ ; над  $5 \times 10^8$ ; над  $6 \times 10^8$ ; над  $7 \times 10^8$ ; над  $8 \times 10^8$ ; над  $9 \times 10^8$ ; над  $10 \times 10^8$ ;
- брой и % проби, съдържащи CD34+, над 100 000, над 300 000, над 500 000.

Таблица 32: Брой и разпределение на общ брой ядрени клетки след обработка (TNC post), според различни минимални изискуеми прагове:

Cut-off points	Брой (х $10^8$ )	Относителен дял
Над $2 \times 10^8$	697	97,9%
Над $3 \times 10^8$	669	94,0%
Над $4 \times 10^8$	613	86,1%
Над $5 \times 10^8$	564	79,2%
Над $6 \times 10^8$	497	69,8%
Над $7 \times 10^8$	418	58,7%
Над $8 \times 10^8$	351	49,3%
Над $9 \times 10^8$	302	42,4%
Над $10 \times 10^8$	248	34,8%

Таблица 33: Брой и разпределение на експресиращи CD34+ (след обработка), според различни минимални изискуеми прагове:

Cut-off points	Брой	Относителен дял
над 100 000	707	99,3%
над 300 000	672	94,4%
над 500 000	618	86,8%

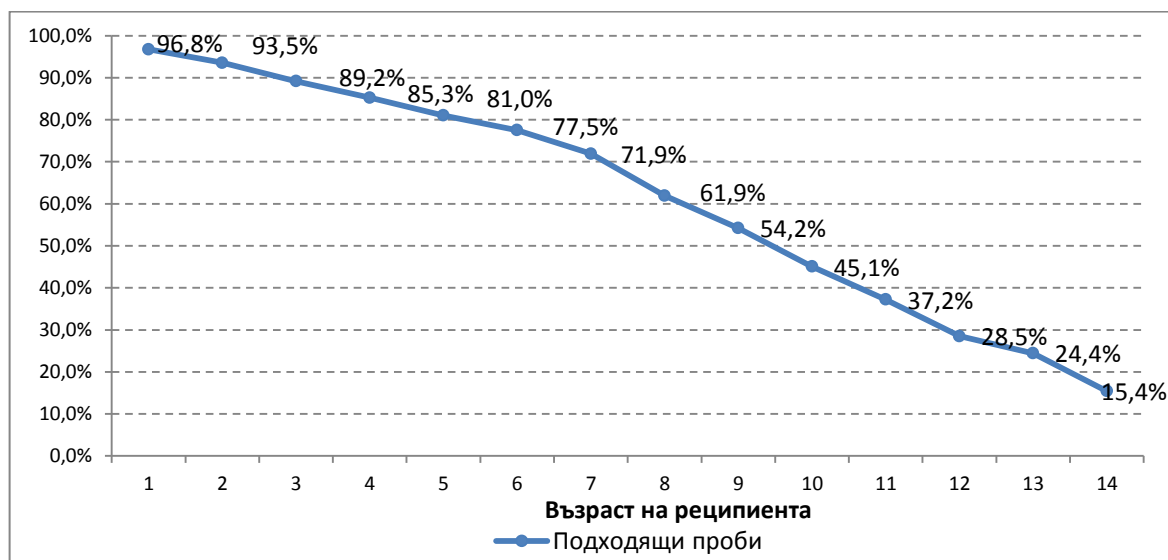
Още по-голям интерес представлява съпоставката на минимално изискуемите прагове със средните клетъчни дози за определени възрастови групи, на базата на статистическите данни за средното тегло, характерно за определена възраст и съответната клетъчна доза. В таблицата по-долу са показани относителните дялове на подходящите проби (осигуряващи съответната клетъчна доза), за пациенти на различна възраст. Вземите предвид минимални клетъчни дози се отнасят до традиционните клинични индикации, целящи хемопоеична реконституция, а данните за средно тегло са адаптирани от биометричните Стандарти за подрастващите на СЗО.

Таблица 34: Относителен дял на подходящите проби

Възраст /в години/	Средно тегло /в килограми/	Относителен дял на подходящите проби
1	9,3	96,8%
2	12,2	93,5%
3	14,5	89,2%
4	16,6	85,3%
5	19	81,0%
6	21	77,5%
7	23,3	71,9%
8	26,8	61,9%
9	29,8	54,2%
10	34,5	45,1%

11	38,8	37,2%
12	43,7	28,5%
13	46,3	24,4%
14	54,3	15,4%

Фигура 11: Относителен дял на подходящите проби спрямо средното тегло за възрастта на реципиента



#### 4.2. Резултати от корелационния анализ

**Фактори, влияещи върху обема, клетъчното съдържание и жизнеността на клетките в единиците умбиликална кръв:**

Дескриптивното проучване на единиците УК показва, че извадката е силно нехомогенна и това със сигурност може да се твърди за целия пуул от проби, съхранявани в частните биобанки за УК. Основните критерии за терапевтична годност на единиците УК са тяхното клетъчно съдържание (TNCpost и CD34+), както и жизнеността на CD34+ след обработката. Резултатите от извършения корелационен анализ са следните:

## Влияние на логистичните фактори:

**Влияние на часа на раждането върху транспортното време ( $T_{total}$ ):** Наличието на такава взаимовръзка е важно само от практическа гледна точка, доколкото времето за транспорт може да бъде съобразено с часа на ражданията на донорите и респективно съкратено. Разделихме часовете на пробовзимане (т.е., на раждане), на дневни - от 08.00 часа до 17.59 часа и нощни - в останалите часове на денонощието, с презумпцията да преценим, дали и доколко нощните раждания оказват статистически значимо влияние върху общото време за транспорт на пробите, до лабораторията. Установихме, че **часът на раждане и пробовзимане оказва умерено силно влияние ( $\eta=0.32$ ) върху общото транспортно време, като „нощните“ проби имат по-продължително общо транспортно време ( $p<0,05$ ), но не влияят върху обема на взетата УК.**

Таблица 35: Час на пробовзимане и общо транспортно време ( $T_{total}$ )

Вид на пробата	Брой	Средно транспортно време
Дневни проби	522	31,5
Нощни проби	199	40,9
Общо	721	34,1

Извършеният дисперсионен анализ установи, че има статистически значима разлика в транспортното време, според часа на пробовземане ( $p<0,05$ ), но големината на ефекта ( $\eta=0.32$ ), показва по-скоро показва умерене големина на ефекта.

**Влияние на транспортното време ( $T_{total}$ ) върху жизнеността на клетъчните субпопулации:** Редица автори са установили обратно-пропорционална връзка между транспортното време ( $T_{total}$ ) и жизнеността на клетъчните субпопулации в УК. Затова, от съществено по-голям интерес за нас беше да потвърдим или да отречем тази връзка и значението ѝ за жизнеността на пробите. Установихме сравнително слаба обратно-пропорционална връзка с линеен характер, т.е. **макар и в малка степен, увеличеното време за транспорт води до намаляване на жизнеността на клетъчните субпопулации във взетите проби от умбилкална тъкан.**

Таблица 36: Резултати от регресионния анализ – транспортното време и жизненост в % на експресиращите CD45:

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,347
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,121
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,000
Регресионен коефициент	b	-0,216

Установената чрез него връзка се описва най-добре чрез линейната функция. Избраният модел е адекватен (Signif F<0,05) и **доказаната връзка е слаба (Multiple R=0,347)**. Коефициентът на детерминация ( $r^2$ ) е 0,121 и показва, че само 12,1% от промените в жизнеността на експресиращите CD45 се дължат на времето за транспорт. Регресионният коефициент показва, че при увеличение на времето с единица, ще очакваме намаление на изследвания процент с 0,216.

Таблица 37: Резултати от регресионния анализ – транспортното време и и жизненост в % на експресиращите CD34:

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,111
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,012
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,003
Регресионен коефициент	b	-0,033

**Спрямо жизнеността на CD34+ доказаната връзка е още по-слаба (Multiple R=0,111)** . Коефициентът на детерминация ( $r^2$ ) е 0,012, което означава, че едва 1,2% от промените в жизнеността (%) се дължат на времето за транспорт. Регресионният коефициент показва, че при увеличение на времето с единица, ще очакваме намаление на изследвания процент с 0,033.

**Влияние на обема взета кръв върху клетъчното съдържание:** Вече беше посочено, че обемът на взетите проби умбиликална кръв, преди обработка се счита за един от важните критерии за оценка на качеството и терапевтичната годност на пробите. Връзката между обема и клетъчното съдържание е очевидна, но в практиката се наблюдават и случаи на дискордантност между обем и клетъчно съдържание (напр. проби с относително голям обем, но ниско клетъчно съдържание и обратно). От тази гледна точка, интерес за нас представляваше силата на връзката между обем и брой на клетките в единиците УК. Все пак, **резултатите потвърдиха очакванията ни за силна връзка между обема на взетата УК влияе силно на клетъчното ѝ съдържание.**

Таблица 38: Корелация между обем и MNCpre

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,750
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,563
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,000
Регресионен коефициент	b	0,058

Избраният модел е адекватен (Signif F<0,05). Връзката е линейна и много силна (Multiple R>0,7). Коефициентът на детерминация( $r^2$ ) е 0,563 и показва, че 56,3% от промените в брой мононуклеари се дължат на обема взета кръв. Регресионният

коэффициент показва, че при увеличение на взетата кръв с единица, ще очакваме увеличение на брой мононуклеари с 0,058.

Таблица 39: Корелация между обем и TNCpre

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,719
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,517
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,000
Регресионен коефициент	b	0,138

Връзката е много силна (Multiple R>0,7) . Коефициентът на детерминация( $r^2$ ) от 0,517 показва, че 51,2% от промените в брой ядрени клетки се дължат на обема взета кръв. Регресионният коефициент показва, че при увеличение на взетата кръв с единица, ще очакваме увеличение на броя ядрени клетки с 0,138.

**Влияние на лабораторната обработка върху клетъчното съдържание:** Вече бе обсъдено, че лабораторната обработка влияе негативно върху клетъчното съдържание. За нас представляваше интерес да обективизираме това влияние, имайки предвид, че единиците УК от извадката са били обработени чрез една от най-ефективните към момента автоматизирани системи, а именно системата Sepax™ (Biosafe, Швейцария).

Таблица 40: Мононуклеари преди и след обработка (MNCpre vs. MNCpost)

Характеристика	Брой	Средна стойност
Мононуклеари преди обработка x $10^8$	712	4,2



Мононуклеари след обработка x 10 <sup>8</sup>	712	3,7
--	-----	-----

Таблица 41: Ядрени клетки преди и след обработка (TNCpre vs. TNCpost)

Характеристика	Брой	Средна стойност
Общ брой ядрени клетки преди обработках 10 <sup>8</sup>	712	10,0
Общ брой ядрени клетки след обработках 10 <sup>8</sup>	712	8,9

Използвахме Т-теста за свързани извадки, за да проверим, дали има разлика в средния брой MNC и TNC, преди и след обработка. Получената стойност  $p < 0,05$  (ИД=95%), ни позволява да твърдим с достатъчно сигурност, че **обработката влияе негативно върху общия брой на ядрените клетки (TNC) и в частност, върху броя на мононуклеарите (MNC)**. Този резултат потвърждава и намереното от други автори .

**Влияние на неонаталните фактори върху показателите на пробите от УК:**  
Счетохме, че е целесъобразно да търсим влиянието на различните неонатални показатели върху клетъчното съдържание на пробите преди обработка, доколкото същите показатели преди криоконсервация, вече са повлияни от ефекта на самата обработка и това би замъглило картината, по отношение на търсените резултати. Доколкото данните за жизненост касаят статуса на две клетъчни субпопулации (CD34+, CD45+) след обработка, то сравнението с тяхната жизненост „след обработка“ е единствената възможност.

**Влияние на вида раждане върху MNCpre, TNCpre, CD34+post и жизненост на CD34+post:**

Таблица 42: Вид раждане и MNCpre

Вид раждане	Брой	Брой мононуклеари преди обработка
Вагинално	221	4,4
Секцио	484	4,1
Общо	705	4,2

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в броя на мононуклеарите (MNCpre) преди обработка, в зависимост от типа раждане ( $p>0.05$ ).**

Таблица 43: Вид раждане и TNCpre

Вид раждане	Брой	Общ брой ядрени клетки преди обработка
Вагинално	221	11,0
Секцио	484	9,6
Общо	705	10,0

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **видът на раждане влияе статистически значимо ( $p<0,05$ ), върху общия брой на ядрените клетки преди обработка (TNCpre), като при родените по естествен път се наблюдава по-голям брой TNCpre. Големината на ефекта е малка ( $\eta=0,11$ ).**

Таблица 44: Вид раждане и CD34+

Вид раждане	Брой	Експресиращи CD34+
Вагинално	221	2 085 838,9
Секцио	484	2 052 680,8
Общо	705	2 063 075,0

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в броя на експресиращите CD34 (CD34+), в зависимост от типа раждане ( $p>0,05$ ).**

Таблица 45: Вид раждане и жизненост CD34+

Вид раждане	Брой	CD34+, жизненост (%)
Вагинално	221	98,6
Секцио	484	98,4
Общо	705	98,5

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в жизнеността на субпопулацията на субпопулацията CD34+ (след обработка), в зависимост от типа раждане ( $p>0,05$ ).**

Таблица 46: Вид раждане и жизненост на CD45+

Вид раждане	Брой	CD45+, жизненост (%)
Вагинално	221	89,5
Секцио	484	91,2
Общо	705	90,7

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **видът на раждането влияе статистически значимо ( $p<0,05$ ), върху жизнеността на субпопулацията CD45+, като пробите на родените със секцио имат относително по-жизнени CD45+. Големината на ефекта е малка ( $\eta=0,10$ ).**

**Влияние на гестационната възраст на новородените върху MNCpre, TNCpre, CD34+post и жизненост на CD34+post:**

Таблица 47: Гестационна възраст и MNCpre

Гестационна възраст	Брой	Брой мононуклеари преди обработка
до 38 г.с. вкл.	285	3,9
след 38 г.с.	424	4,4
Общо	709	4,2

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **гестационната възраст влияе статистически значимо върху броя на мононуклеарите (MNCpre) преди обработка ( $p<0,05$ ), но големината на ефекта е малка ( $\eta=0,11$ ).**

Таблица 48: Гестационна възраст и TNCpre

Гестационен срок	Брой	Общ брой ядрени клетки преди обработка
до 38 г.с. вкл.	285	8,9
след 38 г.с.	424	10,8
Общо	709	10,0

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **гестационната възраст влияе статистически значимо ( $p<0.05$ ) върху общия брой ядрени клетки преди обработка (TNCpre), като пробите на родените след 38-ма г.с. съдържат повече TNCpre. Големината на ефекта е малка ( $\eta=0,16$ ).** В това отношение, нашите резултати потвърждават изводите на други автори.

Таблица 49: Гестационна възраст и CD34+

Гестационна възраст	Брой	Експресиращи CD34
до 38 г.с. вкл.	285	2 032 764,2
след 38 г.с.	424	2 119 904,2
Общо	709	2 084 876,2

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в броя експресиращи CD34+, в зависимост от гестационния срок ( $p>0,05$ ).**

Таблица 50: Гестационен срок и жизненост след обработка (%):

Гестационен срок	Брой	Жизненост след обработка (%):
До 38 г.с. вкл.	285	98.6
Над 38 г.с.	424	98.3
Общо	709	98.5

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в относителния дял на жизненост след обработка в зависимост от гестационния срок ( $p>0.05$ ).**

**Влияние на теглото при раждане върху MNCpre, TNCpre, CD34+post и жизненост на CD34+post:**

Таблица 51: Тегло при раждане и MNCpre

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0.444
Коефициент на детерминация	$r^2$	0.197
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0.000
Регресионен коефициент	b	0.001

Извършен беше регресионен анализ на данните и установената чрез него връзка се описва най-добре, чрез експоненциална функция. Избраният модел е адекватен (Signif  $F<0.05$ ), а доказаната връзка е умерено силна (Multiple  $R=0.444$ ). Коефициентът на детерминация( $r^2$ ) от 0.197 показва, че 19.7% от промените в мононуклеари преди

обработка  $\times 10^8$  се дължат на теглото на детето. **Регресионният анализ установи, че по-високото тегло при раждане може да се свърже с повишен брой MNCpre. Ефектът е слаб**, като при увеличение на теглото с единица, може да се очаква увеличение на броя мононуклеарите с 0,001.

Таблица 52: Тегло при раждане и TNCpre

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,504
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,254
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,000
Регресионен коефициент	b	0,005

**Регресионният анализ установи, че по-високото тегло при раждане може да се свърже с повишен брой TNCpre. Ефектът е слаб**, като при увеличение на теглото с единица, може да се очаква увеличение на броя ядрени клетки с 0,005.

Таблица 53: Тегло при раждане и CD34+

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,301
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,090
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,000
Регресионен коефициент	b	1 408,74

**Регресионният анализ установи, че по-високото тегло при раждане може да се свърже с повишен брой CD34+. Ефектът е умерен,** като при увеличение на теглото на детето с единица, ще очакваме увеличение на броя експресиращи CD34+ с 1 408.

Таблица 54: Тегло при раждане и жизненост на CD34+

Тегло	Брой	Жизненост след обработка (%):
до 3200 гр.	339	98.6
над 3201 гр.	369	98.3
Общо	708	98.5

Тъй като не се намери нито една функция, която да е адекватна, използвахме дисперсионен анализ, който установи, че **няма статистически значима разлика в жизнеността на CD34+ след обработка, в зависимост от теглото на бебето ( $p>0.05$ ).**

**Влияние на пола на новородените върху MNCpre, TNCpre, CD34+post и жизненост на CD34+post:**

Таблица 55: Пол на донора и MNCpre

Пол	Брой	Брой мононуклеари преди обработка
мъжки	394	4,3
женски	318	4,1
Общо	712	4,2

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в броя на мононуклеарите преди обработка, в зависимост от пола ( $p>0.05$ ).** Тук, нашите резултати са конкордантни с резултатите на други автори (192).

Таблица 56: Пол на донора и TNCpre

Пол	Брой	Общ брой ядрени клетки преди обработка
мъжки	394	10,1
женски	318	10,0
Общо	712	10,0

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в средния брой ядрени клетки преди обработка (TNCpre), в зависимост от пола( $p>0.05$ ).**

Таблица 57: Пол на донора и CD34+

Пол	Брой	Експресиращи CD34
мъжки	394	2 316 202,8
женски	318	1 791 258,2
Общо	712	2 081 747,2

Извършеният непараметричен дисперсионен анализ на Кръскал-Уолис установи, че **полът на донора влияе статистически значимо ( $p<0.05$ ) върху броя на субпопулацията експресиращи CD34 (CD34+), като мъжкият пол се свързва с чувствително по-голям брой CD34+.**

Таблица 58: Пол на донора и жизненост на CD34+

Пол	Брой	Жизненост на CD34+ (%):
мъжки	394	98.6
женски	318	98.3
Общо	712	98.5



Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в относителния дял на жизненост след обработка в зависимост от пола ( $p>0.05$ ).**

**Влияние на дължината (ръста) на новородените върху MNCpre, TNCpre, CD34+post и жизненост на CD34+post:**

Таблица 59: Дължина (ръст) на донора и MNCpre

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0,316
Коефициент на детерминация	$r^2$	0,100
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0,000
Регресионен коефициент	b	0,391

Извършеният регресионен анализ установи **слаба връзка между дължината (ръста) на новородените и броя на мононуклеарите (MNCpre)** в техните проби от умбиликална кръв. Установената чрез него връзка се описва най-добре чрез линейна функция. Избраният модел е адекватен ( $\text{Signif } F < 0,05$ ) и доказаната връзка е слаба ( $\text{Multiple } R = 0,316$ ). Коефициентът на детерминация ( $r^2$ ) е 0,100 – това означава, че едва 10,0% от промените в мононуклеари преди обработка  $\times 10^8$  се дължат на дължината на детето. Регресионният коефициент показва, че при увеличение на ръстта на детето с единица, ще очакваме увеличение на броя мононуклеари с 0,391.

Таблица 60: Дължина (ръст) на донора и TNCpre

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0.336

Коефициент на детерминация	$r^2$	0.113
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0.000
Регресионен коефициент	b	1.034

Извършеният регресионен анализ установи **слаба връзка (Multiple R=0.336) между дължината (ръста) на новородените и броя на мононуклеарите (TNCpre)** в техните проби от умбиликална кръв.

Таблица 61: Дължина (ръст) на донора и CD34+

Характеристика	Означение	Стойност
Корелационен коефициент	Multiple R	0.223
Коефициент на детерминация	$r^2$	0.050
Равнище на значимост на F-критерия	Signif F	0.000
Регресионен коефициент	b	2 481.2

Извършеният регресионен анализ установи много **слаба връзка (Multiple R=0.223) между дължината (ръста) на новородените и броя на CD34+** в техните проби от умбиликална кръв.

Таблица 62: Дължина (ръст) на донора и жизненост на CD34+

Ръст	Брой	Жизненост на CD34+ (%)
до 49 см вкл	261	98.5
над 50 см	445	98.5

Общо	706	98.5
------	-----	------

Извършеният дисперсионен анализ установи, че **няма статистически значима разлика в относителния дял на жизненост след обработка, в зависимост от дължината (ръста) на новороденото ( $p>0.05$ ).**

**Влияние на общото състояние на новородените върху MNCpre, TNCpre, CD34+post и жизненост на CD34+post:**

Над 95% от пробите се отнасят до състояние Д – 96.4%, което обезсмисли търсенето на връзки и зависимости, доколкото почти цялата извадка има една характеристика.

#### **4.3. Резултати от анкетното проучване**

Географското разпределение на взетите проби от УК показва силна концентрация в София (64%,  $n=462$ ) и няколкото най-големи града на страната, включително градовете, в които има медицински университет и третично ниво на акушер-гинекологичната помощ [Пловдив – 9,8% ( $n=71$ ); Варна - 9,2% ( $n=66$ ); Бургас – 4,4% (32); Стара Загора – 1,4% (10); Плевен – 2,2% (16); Русе – 1,2 (9)]. Според типа лечебно заведение, взетите проби от частни банки за УК в София са съставлявали 70,1% ( $n=324$ ) от общия брой на взетите проби в града. Вероятно, това се дължи на наличието на няколко големи частни болници с акушеро-гинекологичен профил в столицата. Предвид относително големия брой частни болници в Пловдив, съотношението е още по-силно изместено в полза на частните лечебни заведения - 77,6% ( $n=55$ ). В единствената частна болница с акушеро-гинекологичен профил във Варна са били взети точно 50% ( $n=33$ ) от общия брой проби с УК за града.

Демографския профил на съхранилите в частна банка родилки корелира до голяма степен, но не напълно с географското разпределение, тъй като голям брой от бременните, живеещи в околните по-малки общински центрове раждат в София или в няколкото най-големи града. Например, само 91,6% ( $n=423$ ) от родилите и съхранилите в София, живеят постоянно в града. Кумулативно, за останалите 4 града с университетска клиника по акушерство и гинекология, разликата е още по-голяма [едва 56,4% от съхранилите УК родилки живеят в тези 4 града ( $n=163$ ), докато общият брой

на пробовзиманията там е 289]. Във възрастово отношение, 33,7% (n=243) анкетираните са били на възраст до 25 години, 42,4% (n=306) са били между 26- и 35-годишни, а 23,9% (n=172) са над 35 години. Образователният статус на анкетираните изглежда по следния начин: 73,9% (n=533) са висшистки, а останалите 26,1% (n=188) са посочили средно образование. При това, 44,2% (n=319) работят, а 12,8% (n=92) учат. За 62,1% (n=448) от родилките съхраняването на УК става при 1-вото раждане, докато останалите 37,9% (n=273), са били multipara.

**Обобщеният профил на съхраняващата умбиликална кръв в частна банка родилка е: работеща жена с висше образование, на възраст между 26 и 35 години, живееща най-вероятно в София или някой от по-големите градове в страната. При това, най-вероятно е, пробовземането да се случи в частна болница ( $p < 0.05$ ).**

Отговорите от анкетата по отношение на информираността и мотивацията за съхранение в частна банка изглеждат по следния начин:

Таблица 63: Отговори на анкетното проучване за информираност и нагласи

**Причини за предпочитанието на частна банка:**

	N	%
- „биологична застраховка“ за детето	678	94,04
- в бъдеще УК ще може да бъде използвана по-широко	278	38,56
- за лечение на друг член от семейството	189	12,34
- ненадеждно обществено здравеопазване	413	57,28
- съвет от близки, които вече са съхранили	17	2,36

**Условия, при които биха дарили в обществена банка:**

- ако е сигурно, че така ще помогна на нуждаещ се	498	69,07
- ако пробата е на разположение за собственото дете	546	75,73
- ако пробата не се използва за опити и други цели	293	40,64

**Срок на бременността, когато са взели решение за съхранение:**

- до 33-та гестационна седмица	233	32,32
- след 33-та гестационна седмица	488	67,68

**Посочени източници на информация за кръвта от пъпна връв:**

- акушер-гинеколог	376	52,15
- банка за УК	233	32,32
- училище за бременни	54	7,49
- брошура	22	3,05
- интернет	283	39,25
- познат	137	19,00
- друг източник	9	1,25

**Оценен като най-изчерпателен и най-обективен източник на информация за УК:**

- акушер-гинеколог	288	39,94
- банка за УК	245	33,98
- училище за бременни	18	2,50
- брошура	0	0,00
- интернет	78	10,82
- познат	92	12,76
- друг източник	0	0,00

**Самооценка на степента на информираност за УК на бременните:**

- достатъчно информирани	628	87,10
- нуждаещи се от допълнително информация	93	12,90

**По темата следва да бъдат информирани:**

- всички бременни	578	80,17
- само тези, които се интересуват активно	74	10,26
- без мнение	69	9,57

**Най-често използван източник на стволови клетки:**

- верни отговори	68	9,43
------------------	----	------

**Вероятността от използване на собствената проба:**

- верни отговори	146	20,25
------------------	-----	-------

**Раждането, като възможност за изолиране на стволови клетки:**

- верни отговори	537	74,48
------------------	-----	-------

**Разлики между автоложно и аlogenно приложениена УК:**

- верни отговори	720	99,86
------------------	-----	-------

**Извършване на стволовоклетъчни трансплантации в България:**

- верни отговори	218	30,24
------------------	-----	-------

**Стандартно и експериментално приложение на УК:**

- верни отговори	154	21,36
------------------	-----	-------

**Успеваемост при обработване на взетите проби:**

- верни отговори	95	13,18
------------------	----	-------

**Правно-организационен статут на банките за УК:**

- верни отговори	721	100,00
------------------	-----	--------

**Лицензираща и контролираща банките за УК институция:**

- верни отговори	463	64,22
------------------	-----	-------

**Посетили интернет-страницата на ИАТ:**

- <i>верни отговори</i>	83	11,51
-------------------------	----	-------

#### **Оценка на информацията на страницата на ИАТ:**

- <i>адекватна</i>	27	32,53
- <i>неадекватна</i>	56	67,47

Резултатите от анкетата недвусмислено показват, че **основно място сред мотивационните фактори за избор на родилките заема разбирането за частното банкиране на УК, като вид „биологична застраховка“ [94,04% (n=678)].** При това, логичната конотация за „биологична застраховка“ е, че **съдържащите се в УК стволови клетки биха могли да послужат за лечение във всеки един момент, когато настъпи хипотетичното „застрахователно събитие“, т.е. - заболяването.** Разбира се, **това разбиране контрастира с реалността, доколкото далеч не всички проби от УК биха били подходящи за трансплантация,** най-вече поради недостатъчен клетъчен брой и/или виталитет на пробите (обичайно се наблюдава при 50 до 80% от взетите проби с УК). Дори пробите с достатъчна клетъчна доза за трансплантиране на дете (напр. с достатъчен брой CD34+ и виталитет над 80%), в повечето случаи биха се оказали недостатъчни с нарастване на телесната маса, напред през годините. Очакването за нарастване на потенциалната използваемост на пробите в бъдеще при 38,56% от родилките (n=278) е по-скоро реалистично, с оглед на бурното развитие на регенеративната медицина и в частност, на клетъчните терапии. Относителната тежест и на двата мотивационни фактора кореспондира с резултатите от аналогични проучвания в други държави. **Прави впечатление силният негативизъм към системата на общественото здравеопазване като цяло [57,28% (n=413)],** което веоятно обуславя известна доза недоверие към донорското банкиране на УК.

Особен интерес представляват отговорите на въпроса за условията, при които бременните или родилките биха сменили избора си, т.е., биха избрали да дарят УК. Тук, **при 69,07% (n=498) от анкетираните доминира алтруистичният стремеж „да се помогне на нуждаещия се“,** макар да не става ясно, по каква причина са се усъмнили в наличието на това условие и са избрали частното банкиране. Очакването, дарената пробата да е на разположение за собственото дете [75,73% (n=546)] противоречи на самия смисъл на донорското банкиране. Освен това, поради

по-високите си минимални прагове за клетъчна доза, публичните банки не съхраняват и унищожават до 70 -75% от взетите проби. Не е ясно обаче, доколко подобно очакване бива подхранвано от информационните кампании за донорско банкиране. Накрая, **условието „пробите от УК да не се използват за опити и други цели“ при 40,64% (n=293) вероятно отразява характерен за нашата общност културен феномен**, доколкото не открихме така ясно изразен негативитет към използването за научни цели („опити“) в аналогичните проучвания на чужди автори. Напротив, нормативно постановеното задължение за акушер-гинеколозите в много от американските щати изисква информиране на всяка бременна относно 4 възможни решения за остатъчната УК: 1) донорство; б) семейно съхранение в частна банка; 3) даряване за научни цели и 4) унищожаване, като биологичен отпадък.

Резултатите показват ясно, че повечето бременни правят своя избор за донорство или банкиране на УК, след 33-та гестационна седмица [67,68% (n=488)]. Макар анкетата да засяга само повърхностно въпроса за момента на взимане на решение, вероятно едва към този момент, повечето бременни се считат способни, да вземат информирано решение.

Централно място в анкетата заема въпросът, свързан с източниците на информация за УК, за който мнозинството от анкетираните са дали повече отговори. Подобно на резултатите от други подобни проучвания, за 52,15% (n=376) **водещият източник е акушер-гинекологът**, следван от интернет [39,25% (n=283)]. На трето място са самите биобанки [32,32% (n=233)] и приятелите, имащи съответен личен опит [19,00 (n=137)].

**В оценката за най-изчерпателен и най-обективен източник, водещото място отново е отредено за акушер-гинеколога - 39,94% (n=288).** Любопитно е, че се наблюдава **разлика между броя на отговорите, определящи акушер-гинеколозите, като източник на информация и значително по-малкия дял на отговорите, които ги определят, като най-изчерпателен и най-обективен източник.** Нашата хипотеза е, че доколкото въпросът в анкетата включва двата критерия „изчерпателност“ и „обективност“, то разликата е предимно за сметка на оценката за изчерпателност. На този фон, оценката за биобанките (вероятно най-изчерпателният, но едва ли най-обективният източник в действителност) е сходна с честотата, с която те са посочени като източник на информация [33,98% (n=245)].



Последната част на анкетата цели обективизиране на степента на информираност на родилките. Болшинството от анкетирани се самооценяват като достатъчно информирани 87,10% (n=628), но **тази самооценка контрастира с дела на правилните отговори, на някои ключови въпроси**, касаещи: източниците на стволови клетки в тялото [9,43% (n=68)], вероятността за автоложно изплзване на пробата [20,25% (n=146)], разликата между стандартно и експериментално терапевтично приложение на УК [21,36% (n=154)] и годността („успеваемостта“) на пробите от УК [13,18% (n=95)]. Предвид останалите резултати от проучването, нашата хипотеза е, че това несъответствие може да бъде обяснено с 2 фактора: **1) субективна и подвеждаща информация от страна на частните банки за УК и 2) неадекватна степен на информиране на бременните, от страна на лекарите.** Тази хипотеза се потвърждава от резултатите от анкетата за медици, макар че последната няма претенции за представителност.

Според макар и непредставителната „лекарска анкета“ (*малък брой анкетирани и то, само в ЛЗ където са взимани проби от УК*), **типичният профил на акушер-гинеколозите, които най-често консултират бременни по темата за умбиликалната кръв и взимат проби включва: призната специалност и стаж по специалността над 15 години [84% (n=58)] и работа в частна болница [68% (n=47)], в университетска АГ-клиника, или в специализирана общинска АГ-болница [37% (n=26) за последните 2 типа ЛЗ, заедно].** Акушер-гинеколозите изглеждат далеч по-критични от родилките към степента си на информираност по темата за УК, като **едва 18% (n=12) заявяват, че са достатъчно информирани** относно терапевтичните ѝ приложения. В частта от анкетата, целяща обективизиране на степента на информираност се очертават информационни дефицити, касаещи успеваемостта и годността за трансплантация на взетите проби от УК, където делът на верните отговори е 19% (n=13)], рискът от бактериално замърсяване при пробовзимане [18% верни отговори (n=12)], основните качествени показатели на пробите [39% (n=27)] и използваемостта на УК [21% (n=14)]. До голяма степен, **тези информационни дефицити съответстват на дефицитите при родилките и отразяват въпросите, които изглеждат „неудобни“ за биобанките и поради това, в най-голяма степен са обект на премълчаване или подвеждащи послания** от типа: „всичките ни проби са успешни“, „съхраняваме само проби, които са годни за трансплантация“, „при нас, бактериалното замърсяване е изключено“, „в бъдеще, всеки 3-ти индивид ще се ползва от клетъчни терапии (стволови клетки)“ и др.

## 5. ОБСЪЖДАНЕ:

Въпреки предварителното ограничение (извадката не включва проби от различни биобанки за УК) резултатите от проучването демонстрират наличието на сериозен резерв от криоконсервирани и съхранени в частни банки единици УК (> 15 000), на фона на нищожната наличност в единствената публична банка (~ 250), като и в костно-мозъчния и кръвния регистри. По тази причина, според нас има смисъл от предприемането на мерки за мобилизиране на потенциала на пробите в частните банки, на принципа на хибридно банкиране. Това би могло да бъде осъществено, чрез кампании за HLA-типизиране на донорите в частните банки и качването на профилите им в национален регистър. Още по-голям смисъл би имало, от въвеждане на хибридни принцип на банкиране, като задължителен модел за частните банки у нас.

Данните за биологичните показатели на пробите варират в значителна степен, което демонстрира по-ниските стандарти (минимални прагове за клетъчно съдържание) при частните банки за УК, в сравнение с резултатите от подобни проучвания при публичните банки. Силната зависимост между обема на взетата кръв и клетъчната доза потвърждава ключовата роля на акушер-гинеколога, като извършващ пробовземането. Логично е, банките да подават към акушер-гинеколозите обратна информация, относно показателите на взетите проби, което вероятно ще допринесе за оптимизиране на пробовзиманията. Установените слаби зависимости или липсата на такива, между физиологичните фактори и биологичните показатели на пробите подкрепят тезата, че селекцията на донорите следва да се ръководи, преди всичко от съображения за безопасност (*донорска/майчина анамнеза, асептичност при пробовзимане*), достатъчен обем на пробите (*техника на пробовзимане*) и генетично разнообразие на донорите (*напр. етнически малцинства*).

Показаното ярко несъответствие между оценката за терапевтичния потенциал на единиците УК от една страна и представата на голяма част от бременните и родилките за „биологична застраховка“ от друга страна, създава биоетичен проблем („банките не предоставят това, което обещават“). Самият феномен може да бъде оспорен с различни

аргументи (*възможност за експандиране/намножаване на клетките в бъдеще, клинично приложение, изискващо по-малки клетъчни дози, покриване на „ранния епидемиологичен пик“ и пр.*). При всички положения е необходима прозрачност и обективна, балансирана комуникация между лекаря, бременната и биобанката, като 3 ангажирани с процеса на банкирането страни.

Анализът на резултатите от анкетата поставя редица етични въпроси, относно ролята на акушер-гинеколога за насочване на бременните към алтруистично или към частно банкиране. Наличието на информационни дефицити, както при бременни и родилки, така и при акушер-гинеколозите потенцира дисбаланса в банкирането на УК у нас, в полза на частните банки. Търпи критика липсата на комуникация, по отношение на бактериално контаминираните проби, както от страна на банките към донорите и лекарите, така и към контролиращата дейността институция (ИАТ). Видовете данни, които последната изисква от банките са оскъдни и недостатъчно адекватни, за да повлияят в положителна посока стандартизирането и урегулирането на дейността, както и да защитят интересите на потребителите на услугите по банкиране на УК.

Даряването на умбиликална кръв в обществена банка е чисто алтруистичен акт, имащ потенциала да спаси живота на всеки съвместим реципиент, включително на самия донор, ако пробата все още е на разположение. От друга страна, частното банкиране осигурява наличието на УК, единствено за нуждите на самия донор или на неговите най-близки родственици. У нас, все още не съществува организирана обществена система за банкиране на УК (например, мрежа от малки банки, към всички големи акушеро-гинекологични звена в страната). Присъствието на единствената обществена банка за УК е неосезаемо, особено извън София и няколкото големи града в страната. Поради това, даряването на УК е дори невъзможно, при ражданията в болшинството от селищата на страната. Около 96-97% от остатъчната умбиликална кръв у нас бива унищожавана. Поради това, изборът за болшинството български бременни не е между алтруистично и частно банкиране, а между частно банкиране и унищожаване на УК, като отпадък от раждането. От друга страна, в медицинската литература зачестяват публикациите за УК, като източник на прогениторни и стволови клетки за терапевтично приложение при нехематологични клинични индикации, включително в кардиологията, в неврологията, в ендокринологията и в други области на медицината. В тази насока се провеждат множество предклинични и клинични

проучвания, като резултатите от тях, вероятно ще повлияят развитието на частното банкиране.

## **6. ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **6.1. Изводи**

6.1.1. Качеството на еУК от извадката е съпоставимо и дори по-високо от качеството на пробите в други частни и публични банки. Средните стойности за основните показатели на проучваните проби отговарят и надвишават минималните прагове (cut-off points) за криоконсервация, определени за Националната донорска банка.

6.1.2. Честотата на бактериалните контаминации е сравнима, дори по-ниска, за проучваната извадка. От друга страна, публичните банки не криоконсервират контаминираните проби, докато повечето частни банки го правят.

6.1.3. Оценката на потенциалната терапевтичната стойност показва, че около 34 % от единиците УК в частния резерв биха били подходящи за реципиенти с тегло до 40 – 50 кг. Само 15,4% от съхраняваните проби биха осигурили достатъчна клетъчна доза за своя донор, след като той/тя навърши 14 годишна възраст. Тази оценка е условна и важи само по отношение на стандартните индикации за хемопоетична реконституция.

6.1.4. Установеното средно транспортно време за пробите от УК е 34,1 часа, като за 40% от тях, то е в рамките на 27 часа. Това е по-близо до препоръчвания за обществените банки лимит от 24 ч и достатъчно далеч от максимално допустимия времеви прозорец от 72 часа. Поради важността на този фактор за жизнеспособността на клетките, би следвало информацията за транспортното време да се отчита и анализира от ИАТ, както и да бъде предоставяна на донорите в частните банки.

6.1.5. Средният обем взета умбиликална кръв е 95,4 мл. Над 84% от изследваните проби покриват минималния праг от 60 мл. Обемът на взетата УК е показател, който в най-голяма степен зависи от квалификацията и опита на пробовзимащия акушер-гинеколог. За да се насърчи взимането на по-голям обем УК и да бъде постигнат добър „комплайънс“ във времето е удачно, информацията за този показател да бъде комуникирана с пробовзимащите специалисти. Принципът по отношение на обема на взетата УК е „колкото повече, толкова по-добре“.

6.1.6. Установената средна стойност на общия брой ядрени клетки преди обработка е  $10,0 \times 10^8$ , като в резултат на обработката показателят спада с около 11%, до  $8,9 \times 10^8$ . Според броя на TNCpost, само около 14 % от съхраняваните еУК, биха били подходящи за хемопоетично реконституиране на възрастен индивид, с тегло 60 – 70 кг. Този биологичен показател е основен критерий за терапевтична приложимост на еУК, поради което следва да бъде отчитан и анализиран от ИАТ, както и да се комуникира с пробовзимащия акушер-гинеколог.

6.1.7. Средното съдържание на експресиращи CD34+ за пробите в извадката е  $21 \times 10^5$ . Само около 3 % от съхраняваните еУК, биха били подходящи за хемопоетично реконституиране на възрастен индивид, с тегло 50 – 70 кг. Този биологичен показател е основен критерий за терапевтична приложимост на еУК, поради което следва да бъде отчитан и анализиран от ИАТ, както и да се комуникира с пробовзимащия акушер-гинеколог.

6.1.8. Средната стойност за жизнеността на CD34+ субпопулацията след обработка е 98,5%, като извадката е хомогенна, по отношение на този показател.

6.1.9. Установен бе висок % на плановите раждания (69%). Допускаме, че това се дължи и на факта, че по-голямата част от пробите от умбиликална кръв са взети при раждания в частни акушеро-гинекологични болници, където % на ражданията със секцио е по-висок.

6.1.10. Пробите УК от новородени момчета са с 10% повече от тези, взети от момичета. Тази разлика значително надвишава естествения феномен на превес на мъжкия пол (около 2,5 % разлика за 2016 г.). Интересно е да се проучи, дали зад това стои културен феномен или има друга причина.

6.1.11. При 48 проби (6,7 %) се установи замърсяване с банална кожна и гастро-интестинална микрофлора, което най-вероятно е станало по време на пробовзимането. Този % е в рамките на обичайното. Открива се статистически значима връзка с вагинално раждане (93% от случаите,  $p < 0,05$ ). Замърсяванията са били комуникирани с родителите на донора, но въпреки това, 79% от родителите са пожелали да продължат с криоконсервацията на УК. Бактериалните контаминации са неизбежен феномен и са важен ограничаващ фактор за терапевтичната приложимост на еУК, поради което следва да бъдат отчитани и анализирани от ИАТ, както и да се съобщават на пробовзимащия акушер-гинеколог.

6.1.12. Корелационният анализ потвърди очакваната силна връзка между обема на взетата УК и клетъчното ѝ съдържание. Корелациите с другите неонатални (физиологични) фактори са без особено значение за практиката и селекцията на донори.

6.1.13. Около 94% от анкетираните възприемат частното банкиране на УК, като вид „биологична застраховка“, която може да спаси живот, в случай, че „застрахователното събитие“ настъпи, дори 20-25 години след съхранението. Това очакване контрастира силно с резултатите от оценката на терапевтичната стойност на пробите и следва да бъде дискутирано публично и в етичен аспект.

6.1.14. Над 80% от анкетираните жени смятат, че всяка бременна следва да бъде информирана за възможностите да дари ли да съхрани кръв от пъпна връв, но едва 1/5 от акушер-гинеколозите се считат достатъчно подготвени, за да предоставят адекватна информация по темата. Решаването на този проблем предполага продължаващо обучение и по-добра комуникация между биобанките и акушер-гинеколозите, без да се прикриват „неудобните“ факти.

6.1.15. Около 96-97% от остатъчната умбиликална кръв у нас бива унищожавана. Поради това, изборът за болшинството български бременни не е между алтруистично и частно банкиране, а между частно банкиране и унищожаване на УК, като отпадък от раждането.

6.1.16. Нищожните наличности в националния костно-мозъчен регистър (<700 заявени донора) и в единствената обществена банка за УК (~250 еУК) предполагат дефицит на този вид биологичен материал. Следва да се търсят начини за по-рационално използване на резерва в частните банки за УК, като силно препоръчително е въвеждането на задължително хибридно банкиране за частните банки, по примера на други държави.

## **6.2 Заключение**

На базата на представителна извадка от 721 криосъхранени биологични проби, представяме анализ, на близо 15 000-ия резерв от единици умбиликална кръв, криоконсервирани и съхранявани в българските частни банки. Първоначалната хипотеза, че вероятно пробите в резерва не отговарят по качество и терапевтична стойност на представите за дълготрайна „биологична застраховка“ се потвърди частично, тъй като установихме, че след 14-годишен период на криосъхранение, едва 15,4% от съхранените проби биха били негодни за автоложно приложение (каквато е презумпцията на частното банкиране!), поради неадекватна клетъчна доза. Въпреки

това, качеството на резерва от единици УК в българските частни банки е съпоставимо и дори по-високо от качеството на биологичен материал в други частни и публични банки.

По отношение на влиянието, на логистични, лабораторни и неонатални фактори върху качеството и терапевтичната пригодност на съхраняваните еУК потвърдихме резултатите на редица изследователи, относно критичното значение на обема взета умбиликална кръв. Това потвърждава ключовата роля на акушер-гинеколога и техниката на пробовзимане. Считаме, че резултатите за влиянието на фактори, като вид на раждането и пол са по-скоро „анекдотични“, доколкото силата на ефекта е малка, а в литературата се срещат противоречиви съобщения за влиянието на тези фактори. Интерес представляват данните за честотата на бактериалните замърсявания, доколкото наблюденията ни показват, че те по правило не биват съобщавани и обсъждани, нито със съхранилите родилки, нито с взелите пробите акушер-гинеколози. Това създава потенциален етичен проблем.

По отношение на информираността и нагласите сред бременните, родилките и сред акушер-гинеколозите, резултатите потвърдиха несъответствието между очакванията и представите за банкирането на умбиликална кръв, на бременните от една страна и действителните възможности, които предлага тази дейност, от друга страна. Резултатите за терапевтичната пригодност на пробите контрастират силно с преобладаващото разбиране на 94% от анкетираните за частното банкиране на УК, като за вид „биологична застраховка“. Смущаващ е фактът, че над 80% от анкетираните жени смятат, че всяка бременна следва да бъде информирана за възможностите да дари или да съхрани кръв от пъпна връв, но едва 1/5 от акушер-гинеколозите се считат достатъчно подготвени, за да предоставят адекватна информация по темата.

Също така, резултатите от настоящото проучване подчертават нуждата от адекватна здравна политика, по отношение на банкирането на умбиликална кръв, с оглед осигуряване на популационните нужди от източници на хемопоеични- и други прогениторни клетки, за целите на хемопоеичната трансплантация и навлизащите в практиката клетъчни терапии.

Даряването на умбиликална кръв в обществена банка е чисто алтруистичен акт, имащ потенциала да спаси живота на всеки съвместим реципиент, включително на самия донор, ако пробата все още е на разположение. От друга страна, частното

банкиране осигурява наличието на пробата, единствено за нуждите на самия донор или на неговите най-близки родственици. У нас, все още не съществува организирана обществена система за банкиране на УК (например, мрежа от малки банки, към всички големи акушеро-гинекологични звена в страната). Присъствието на единствената обществена банка за УК е неосезаемо, особено извън София и няколкото големи града в страната. Поради това, даряването на УК е дори невъзможно, при ражданията в болшинството от селищата на страната. Около 96-97% от остатъчната умбиликална кръв у нас бива унищожавана. Поради това, изборът за болшинството български бременни не е между алтруистично и частно банкиране, а между частно банкиране и унищожаване на УК, като отпадък от раждането. От друга страна, в медицинската литература зачестяват публикациите за УК, като източник на прогениторни и стволови клетки за терапевтично приложение при нехематологични клинични индикации, включително в кардиологията, в неврологията, в ендокринологията и в други области на медицината. В тази насока се провеждат множество предклинични и клинични проучвания, като резултатите от тях, вероятно ще повлияят развитието на частното банкиране на УК. При всички положения, умбиликалната кръв е уникален биологичен ресурс, чиято реализация тепърва ще се разраства. Сега и в бъдеще ще е от особена важност, всяка съхранявана и предоставяна единица УК да отговаря на най-високите международни стандарти за безопасност и качество. Банките за УК, както и всички ангажирани в процеса (включително акушер-гинеколозите) следва да си сътрудничат, за да осигурят качествен и достатъчен по обем национален пуул от клетъчни проби, покриващ популационните нужди. Досега, няма данни за използвана за лечение проба от обществената банка за УК, а от над 15-те хиляди проби в частните банки се знае за една единствена, която е отпусната и използвана за лечение. От друга страна, докато частните банки покриват разходите си от таксите за съхранение, то за обществената банка е по-добре да се самоиздържа, отколкото да разчита на държавна субсидия. Самоиздръжката ѝ може да се реализира, при въвеждане на съответен административно-финансов механизъм, най-добре чрез финансиране на дейността ѝ от здравните каси. Това оже да се случи единствено, ако има терапевтична реализация на повече проби. Критична роля за терапевтичната реализация на пробите има тяхното клетъчно съдържание. От тази гледна точка е необходима оптимална селекция на донорите и прецизирани минимално изискуеми прагове за клетъчно съдържание. За обществените банки, понастоящем тези прагове следва да не са по-ниски от  $9 - 10 \times 10^8$  за общия брой ядрени клетки (TNC) и  $8 - 9 \times 10^5$  за CD34+ субпопулацията.



Компетентният орган (ИАТ) следва да изисква, отчита и анализира данните за клетъчно съдържание и жизненост на еУК, както и данните за бактериални замърсявания, за да може да осигури повече обществено-здравна полза от тази дейност.

## **7. НАУЧНИ ПРИНОСИ**

### **7.1. Научни приноси с оригинален характер**

- За първи път е охарактеризирана и оценена мащабна извадка от частно банкирани проби, която е представителна за националния резерв от единици умбиликална кръв;
- За първи път са изследвани нагласите и информираността, по отношение на донорството и банкирането на УК сред бременни и родилки, избрали семейното съхранение в частна банка;
- Изследването е първото по мащаба си у нас.

### **7.2. Научни приноси с потвърдителен характер**

- Проучена е значителна по обем литература и е направен обстоен и цялостен анализ на дейността по банкиране на умбиликална кръв, като практиките у нас са съпоставени със световната практика;
- Изследвани са взаимовръзките между логистични, лабораторни и неонатални фактори от една страна, и качествените показатели на пробите от умбиликална кръв от друга страна, като са потвърдени или отхвърлени резултатите на други изследователи/

### **7.3. Научни приноси с практически характер**

- Предложени са мерки за оптимизация на дейността по банкиране на умбиликална кръв и на националния резерв от единици УК;
- Формулирани са конкретни препоръки за оптимизиране на вида и обема на информацията и биологичните показатели за УК, които биват съобщавани на пробовзимащия акушер-гинеколог и на компетентния орган (ИАТ).

## **Благодарности**

*Изказвам специална благодарност към научния ми ръководител, доц.д-р Иван Костов дмн, както и на всички членове на почитаемото Научно жури. Поднасям благодарност и на колегите от моя екип, които ме подкрепиха, поемайки част от обичайните ми служебни задължения, докато работих върху дисертационния труд.*

## **Конфликт на интереси**

Доколкото дисертантът работи в частна банка за УК съществува потенциален конфликт на интереси, но считаме, че настоящият труд демонстрира в достатъчна степен усилието за еманципиране от условностите на работното място и за обективен подход към темата.

## **Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд**

1. Пачеджиев А, Петров П, Божилова Е, Хамова В, Ирмов В. Нагласи и предпочитания към даряването или семейното съхранение на кръв от пъпна връв, Съвременна медицинска наука, 2017/3: 76-83.
2. Пачеджиев А, Костов И, Божилова Е. Контаминации при пробите от умбиликална кръв. Акушерство и гинекология, 2017/9.
3. Пачеджиев А, Костов И. Банкиране на умбиликална кръв: ситуацията по света и у нас. Акушерство и гинекология, 2017/10.